

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Mijona Zelen

**PRISILNA RAZGRADNJA LJEKOVITIH TVARI I FARMACEUTSKIH
OBLIKA**

Specijalistički rad

Zagreb, 2019.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 23.04.2019. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Biljana Nigović
2. Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, znan. savj.
3. Izv. prof. dr. sc. Anita Hafner

Rad ima 86 listova.

PREDGOVOR

Provedeno istraživanje izrađeno je u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Na odabir teme završnog specijalističkog rada utjecalo je moje radno iskustvo u farmaceutskoj industriji i potreba za širenjem znanja. Dodatno zanimanje za temu potaknuto je nedostatkom službenog dokumenta ili smjernica od strane regulatornih tijela koji obuhvaćaju isključivo prisilnu razgradnju ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika. Iz tog razloga rad bi trebao predstavljati sažeti pregled ovako opširne tematike.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na iznimom strpljenju, podršci i stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se također svojoj obitelji i kolegama na podršci.

SADRŽAJ

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1.	Svrha prisilne razgradnje	2
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3.	MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	4
3.1.	Onečišćenja u lijekovima	4
3.2.	Vrste onečišćenja	4
3.2.1.	Organska onečišćenja.....	4
3.2.2.	Anorganska onečišćenja.....	5
3.2.3.	Ostatna otapala	6
3.3.	Kontrola onečišćenja.....	7
3.3.1.	Analitičke tehnike za ispitivanje profila čistoće lijeka	11
3.4.	Pregled regulative	13
3.4.1.	ICH smjernice	13
3.4.2.	ICH Q1A(R2) – ispitivanje stabilnosti novih ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika.....	14
3.4.3.	ICH Q1B – ispitivanje fotostabilnosti novih ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika.....	16
3.4.4.	ICH Q2(R1) – Validacija analitičkih procedura	16
3.4.5.	ICH Q3A(R2) – Onečišćenja u novim ljekovitim tvarima	17
3.4.6.	ICH Q3B(R2) – Onečišćenja u novim farmaceutskim oblicima	17
3.4.7.	ICH Q5C – Stabilitetna ispitivanja biotehnoloških/bioloških proizvoda.....	17
3.4.8.	M4Q(R1) – Zajednički tehnički dokument: Kvaliteta	18
3.4.9.	Svjetska zdravstvena organizacija	18
3.4.10.	Američka agencija za hranu i lijekove.....	21
3.4.11.	Europska agencija za lijekove.....	24
3.4.12.	Ostatak svijeta	26
3.4.12.1.	Kanada	26
3.4.12.2.	Južna Amerika.....	26
3.4.12.3.	Središnja Amerika i Karibi	27

3.4.12.4.	Afrika	28
3.4.12.5.	Južna Azija.....	28
3.4.12.6.	Indija	29
3.4.12.7.	Australija i Novi Zeland.....	29
4.	RASPRAVA	30
4.1.	Prisilna razgradnja.....	30
4.2.	Početak studije prisilne razgradnje	31
4.3.	Granica prisilne razgradnje	32
4.4.	Odabir uvjeta prisilne razgradnje	32
4.4.1.	Odabir koncentracije ljekovite tvari za prisilnu razgradnju.....	33
4.5.	Uvjeti prisilne razgradnje	33
4.5.1.	Hidroliza.....	33
4.5.2.	Razgradnja pod utjecajem temperature	37
4.5.3.	Oksidacija.....	40
4.5.3.1.	Autooksidacija (oksidacija potaknuta radikalom).....	40
4.5.3.2.	Oksidacija potaknuta peroksidom	43
4.5.3.3.	Oksidacija potaknuta transferom elektrona.....	44
4.5.4.	Razgradnja pod utjecajem svjetla (fotoliza).....	44
4.6.	Razvoj stabilitetno-indikativne metode za određivanje sadržaja ljekovite tvari	48
4.6.1.	Korak I - proučavanje strukture ljekovite tvari	48
4.6.2.	Korak II - informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima ljekovite tvari	49
4.6.3.	Korak III – studija o prisilnoj razgradnji	50
4.6.4.	Korak IV – preliminarna razvojna studija.....	51
4.6.5.	Korak V – optimizacija razvojne metode	52
4.6.6.	Korak VI – identifikacija i karakterizacija nastalih razgradnih produkata i priprema standarda	53
4.6.7.	Korak VII – validacija SIM metode za određivanje sadržaja	54
4.6.8.	Kritični parametri vezani uz razvoj i validaciju SIM metoda	55
4.6.8.1.	Definicija i razlika specifičnosti i selektivnosti metode	55
4.6.8.2.	Da li specifično stabilitetno-indikativna metoda ima svrhu i da li je regulatorno prihvatljiva?	56

4.6.8.3.	Da li je nužno koristiti stres ispitivanja za razvoj stabilitetno indikativne metode?	57
4.6.8.4.	Da li su farmakopejske metode za sadržaj stabilitetno indikativne?	57
4.6.9.	Balans mase.....	58
4.6.10.	Čistoća kromatografskih pikova	59
4.6.11.	QbD.....	60
4.7.	Eksperimentalni primjer.....	64
4.7.1.	Uvjeti razgradnje lamivudina.....	65
4.7.2.	Uvjeti kromatografske metode.....	66
4.7.3.	Rezultati kromatografske analize.....	66
4.7.4.	Fragmentacija lamivudina pomoću MS-a	68
4.7.5.	Mehanizam razgradnje lamivudina	71
5.	ZAKLJUČAK	74
6.	LITERATURA.....	76
7.	KRATICE	83
8.	ŽIVOTOPIS	85

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je napraviti pregled i sažetak smjernica regulatornih tijela o prisilnoj razgradnji kao i detaljan vodič o eksperimentalnom provođenju prisilne razgradnje i razvoju stabilitetno-indikativne analitičke metode.

MATERIJALI I METODE

U ovom teorijskom specijalističkom radu korištena je dostupna znanstvena literatura o prisilnoj razgradnji i pojmovima vezanim uz prisilnu razgradnju. Pregled literature uključuje publicirane znanstvene članke, najnovija izdanja odabranih knjiga, trenutno važeće verzije smjernica regulatornih tijela, kao i razne elektroničke izvore.

RASPRAVA

Prema ICH smjernicama prisilna razgradnja definirana je kao izloženost ljekovite tvari ili gotovog farmaceutskog proizvoda uvjetima jačim od ubrzanih stabilitetnih uvjeta. I regulatorna tijela i ostala dosad provedena istraživanja naglašavaju važnost provedbe studije o prisilnoj razgradnji zbog mogućnosti predviđanja dugoročne stabilnosti ljekovite tvari i/ili farmaceutskog oblika na temelju dobivenih rezultata. Smjernice regulatornih tijela daju neke opće preporuke o prisilnoj razgradnji, ali ne daju detaljne i jasne upute kako provoditi studiju.

Uvjeti za izvođenje prisilne razgradnje obično uključuju izlaganje reprezentativnih uzoraka ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika povišenoj temperaturi, vlazi, fotolizi, kiseloj i lužnatoj

hidrolizi i oksidaciji. Za hidrolitičke uvjete najčešće se koristi klorovodična ili sumporna kiselina i natrijev ili kalijev hidroksid, koncentracije 0.1-1 mol/L, a za uvjete oksidacije otopina vodikovog peroksida. Za izloženost fotolitičkim uvjetima većina istraživanja se poziva na ICH poglavlje Q1B dok se za procjenu utjecaja temperature i vlage, razgradnja najčešće provodi na temperaturama od 40°C do 80°C i pri 75%RV ili više.

Nastali razgradni produkti, koji mogu, ali ne moraju nastati prilikom izloženosti lijeka uobičajenim dugoročnim stabilitetnim uvjetima, nužni su za razvoj stabilitetno-indikativne metode.

ZAKLJUČAK

U novije vrijeme prisilna razgradnja postala je najvažniji alat u predviđanju dugoročne stabilnosti lijekova. Iz tog razloga studija prisilne razgradnje trebala bi biti sastavni dio razvojnog procesa svakog farmaceutskog proizvoda.

SUMMARY

OBJECTIVES

The aim of this work is to make a summary of all regulatory guidelines and also a detailed guide of the experimental implementation of forced degradation and development of stability indicating analytical method.

MATERIALS AND METHODS

In this theoretical specialist thesis, available scientific literature on forced degradation study and the terms associated with it, was used. The literature review includes published scientific articles, latest editions of selected books, current versions of the regulatory guidelines as well as various electronic sources.

DISCUSSION

Both, regulatory and scientific researches emphasize the importance of conducting forced degradation studies for predicting long-term stability of active drug substances and / or finished products. The regulatory agencies give some general recommendations for conducting forced degradation study but they do not give clear and detailed guidance on how to carry out the forced degradation study.

Conditions for conducting forced degradation study usually involve exposure of representative drug substance or pharmaceutical form samples to elevated temperature, humidity, photolysis, acidic and basic hydrolysis, and oxidation.

For hydrolytic conditions, hydrochloric or sulfuric acid and sodium or potassium hydroxide, with concentrations in range 0.1-1 mol/L are usually used. For oxidation conditions different concentrations of hydrogen peroxide solution are used. For exposure to photolytic conditions most studies are performed according to ICH Q1B, while exposure to temperature and humidity is usually carried out at temperatures from 40 ° C to 80 ° C and 75% RH or more.

Obtained degradations products, which are not necessary formed during long term stability conditions, are most important part of the development of the stability indicating method.

CONCLUSION

More recently forced degradation has become the most important tool in predicting the long-term stability of the drug. For this reason, forced degradation studies should be an integral part of the development process of each pharmaceutical product.

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Prisilna razgradnja je razgradnja ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika pod uvjetima jačim od uobičajenih, ubrzanih ili dugoročnih stabilitetnih uvjeta. Prisilna razgradnja pruža uvid u moguće puteve razgradnje i produkte ljekovite tvari, čija je identifikacija zatim moguća pomoću dostupnih analitičkih postupaka. Nastali razgradni produkti, koji mogu, ali ne moraju nastati prilikom izloženosti lijeka dugoročnim stabilitetnim uvjetima, nužni su za razvoj stabilitetno-indikativne metode. Preporuka je studiju razgradnje započeti što ranije, u razvojnoj fazi lijeka, da bi se prikupilo što više informacija o stabilnosti molekule i kasnije formulacije.

Stabilnost je kritičan parametar svakog lijeka i kao takav utječe na njegovu čistoću, djelotvornost i općenito na sigurnost primjene farmaceutskog proizvoda. Promjene u stabilnosti lijeka mogu dovesti do smanjenja doze i učinkovitosti, kao i do nastanka toksičnih razgradnih produkata. Iz tog razloga iznimno je važno istražiti profil nastalih onečišćenja pod promjenama raznih vanjskih uvjeta, kao što su temperatura, vlaga, svjetlost, pH vrijednost i drugi. Kada se govori o eksperimentalnim uvjetima pod kojima se izvodi prisilna razgradnja najčešće se spominju hidrolitički (kiselina ili lužina), oksidacijski, fotolitički i termički uvjeti.

Trenutno postoji nekoliko regulatornih smjernica koje daju preporuke o izvođenju studije prisilne razgradnje, ali nijedna od njih ne daje detaljne i jasne upute ili definicije kako točno provoditi studiju, primjerice uvjete razgradnje ili vrijeme izloženosti. To dovodi do nesigurnosti i razilaženja u tumačenjima između različitih farmaceutskih kompanija, što opet dovodi do različitih pristupa i izvedbi studija prisilne razgradnje. Procjena uvjeta razgradnje i/ili vremena

izloženosti pojedinim uvjetima trenutno se temelji na dosadašnjim istraživanjima i iskustvima farmaceuta te karakteristikama pojedine molekule.

1.1. Svrha prisilne razgradnje

Svrha prisilne razgradnje u razvoju lijeka može se razložiti na puno stavaka, kao što su:

- dobiti uvid u razgradne puteve ljekovite tvari i farmaceutskog oblika
- objasniti kemijska svojstva molekule ljekovite tvari
- odrediti strukture razgradnih produkata
- mogućnost otkrivanja razgradnih mehanizma (npr. hidroliza, oksidacija, termoliza ili fotoliza) ljekovite tvari i farmaceutskog oblika
- mogućnost razlikovanja razgradnih produkata koji su povezani s ljekovitom tvari od onih koji su nastali od neke druge komponente u formulaciji
- dobiti razgradni profil sličan onome koji bi nastao prilikom stabilitetne studije pod propisanim dugoročnim uvjetima
- razvoj stabilitetno-indikativne metode
- razvoj stabilnog farmaceutskog oblika.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u ovom teorijskom specijalističkom radu je dobiti uvid u trenutno važeće regulatorne smjernice, uključujući ICH, EMA, FDA, WHO, o studiji prisilne razgradnje ljekovite tvari i farmaceutskog oblika, napraviti pregled preporuka za izvođenje studije o prisilnoj razgradnji, što uključuje eksperimentalne uvjete za reakciju hidrolize, oksidacije, termolize i fotolize, te opisati razvoj i validaciju stabilitetno-indikativne metode u sklopu koje je bitno dobiti balans mase i potvrditi čistoću i kvalitetu proizvoda. Dodatno, istraživanje će obuhvatiti statistički eksperimentalni dizajn koji se koristi prilikom razvoja analitičkih procedura, kao i ekperimentalni primjer prisilne razgradnje pri otkrivanju razgradnih mehanizama molekule lamivudina.

3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. Onečišćenja u lijekovima

Onečišćenja u farmaceutskoj industriji su neželjeni spojevi u lijekovitoj tvari koji mogu zaostati iz proizvodnog postupka, nastati tijekom izrade i skladištenja farmaceutskog proizvoda, ili mogu potjecati iz same lijekovite tvari.¹

Prema definiciji ICH smjernica, onečišćenje je svaki sastojak lijekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao lijekovita tvar² ili svaki sastojak farmaceutskog oblika koji nije lijekovita ili pomoćna tvar u proizvodu.³

Samo mala količina nekog onečišćenja može utjecati na učinkovitost i sigurnost lijeka, stoga je njihova kontrola iznimno važna i već duže vremena pod strogom kontrolom regulatornih tijela.

3.2. Vrste onečišćenja

Prema ICH smjernicama, onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala.²

3.2.1. Organska onečišćenja

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa i/ili pri skladištenju lijekovite tvari ili farmaceutskog oblika. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva, a uključuju:¹

- početne sirovine i međuprodukte - ovo su najčešća onečišćenja koja se mogu naći u lijekovitoj tvari, osim ako proizvođač može osigurati da se svaki korak sinteze strogo kontrolira tako da se takva onečišćenja izbjegnu
- nusprodukte - onečišćenja koja nastaju usporedno s konačnim ciljanim produktom (100%-tno iskorištenje u organskoj sintezi je rijetkost)
- procesne i razgradne produkte - procesna onečišćenja nastaju tijekom proizvodnog procesa lijekovite tvari, dok razgradna nastaju pod utjecajem raznih čimbenika tijekom skladištenja lijekovite tvari
- reagense, ligande i katalizatore - rijetko se mogu pronaći u lijekovitoj tvrti, ali u nekim slučajevima su prisutni kao onečišćenja.

Kao posebna skupina mogu se još izdvojiti enantiomerna onečišćenja koja se pojavljuju kod optički aktivnih lijekovitih tvari.

3.2.2. Anorganska onečišćenja

Anorganska onečišćenja uglavnom zaostaju iz proizvodnog procesa. Najčešće su poznata i identificirana, a obuhvaćaju:¹

- anorganske katalizatore, reagense i ligande - iako rijetko, pojavljuju se kao ostatci iz sinteze i proizvodnog procesa
- teške metale - glavni izvor teških metala je voda koja se koristi u samom proizvodnom procesu i/ili reaktorima (od nehrđajućeg čelika). Mogu se izbjeći korištenjem demineralizirane vode ili korištenjem reaktora obloženih sa staklom.

- ostale materijale - odnose se na drveni ugljen i tvari koje se koriste za filtraciju, poput dijatomejske zemlje, silika gela, celuloze, te teške metale i druge zaostale metale.

3.2.3. Ostatna otapala

Ostatna otapala su zaostale, hlapljive organske kemijske tvari koje se rabe ili nastaju u postupku proizvodnje lijeka. ICH smjernice propisuju granice za otapala koja mogu zaostati u ljekovitim i pomoćnim tvarima nakon proizvodnje, a one ovise o toksičnosti otapala, načinu primjene i dozama lijeka. Ovisno o potencijalnom riziku za ljudsko zdravlje, ostatna otapala su podijeljena u tri skupine:⁴

- prva skupina ostatnih otapala - obuhvaća otapala koja se moraju izbjegavati zbog dokazane karcinogenosti ili sumnje na karcinogenost u ljudi, te otapala opasna za okoliš
- druga skupina ostatnih otapala - otapala čija upotreba treba biti ograničena zbog moguće neurotoksičnosti, teratogenosti i drugih tipova toksičnosti
- treća skupina ostatnih otapala - otapala niske toksičnosti i malog rizika za zdravlje ljudi.

Ova podjela većinom se odnosi na ljekovitu tvar iako samim tim obuhvaća i onečišćenja za farmaceutski oblik. Onečišćenja vezana za samu formulaciju odnose se na:¹

- onečišćenja koja su nastala pod utjecajem nekog od procesnih parametara (npr. temperatura autoklaviranja)
- onečišćenja koja su nastala pod utjecajem vanjskih čimbenika (visoka temperatura, svjetlo i vlaga)

- onečišćenja vezana za odabir dozirnog oblika (npr. tekući dozirni oblici su u većoj mjeri podložni razgradnim i mikrobiološkim onečišćenjima)
- onečišćenja koja nastaju interakcijama između komponenti formulacije
- onečišćenja koja nastaju razgradnjom vezanom uz funkcionalnu grupu (hidroliza, oksidacija, fotoliza, dekarboksilacija)
- onečišćenja koja nastaju kristalizacijom, ispiranjem ili sušenjem tijekom proizvodnog procesa
- onečišćenja koja potječu od odabrane ambalaže.

3.3. Kontrola onečišćenja

Kontrola onečišćenja postiže se definiranjem zahtjeva kakvoće (specifikacije) za ljekovitu tvar i/ili farmaceutski oblik. Specifikacija obuhvaća set parametara koji se određuju zadanom analitičkom procedurom te prikladne kriterije koje ti parametri moraju zadovoljiti. Kroz specifikaciju se definiraju osnovni te kritični i/ili specifični parametri koje predlaže i obrazlaže proizvođač, a u konačnici ih odobravaju regulatorna tijela.⁶

Onečišćenja su jedan od parametara svake specifikacije, a definiraju se na temelju razvojne studije, studije o prisilnoj razgradnji, stabilitetne studije i rutinskih analiza.

Prvi dio ICH smjernica za onečišćenja obuhvaća identifikaciju onečišćenja, izradu izvještaja, postavljanje zahtjeva i ograničavanje količine onečišćenja dok drugi dio, koji se odnosi na procjenu biološke sigurnosti, obuhvaća smjernice za onečišćenja koja se nalaze u količini većoj od one koja je propisana za ispitivanje sigurnosti primjene lijeka.

Opće granice (pragovi) za onečišćenja definirane su u ICH poglavlju Q3A(R2) za novu ljekovitu tvar² i u poglavlju Q3B(R2) za novi farmaceutski oblik.³ U Tablici 1 i 2 navedeni su prag izvještavanja (eng. *Reporting threshold*), prag identifikacije (eng. *Identification threshold*) i prag kvalifikacije (eng. *Qualification threshold*), čije vrijednosti ovise o maksimalnoj dnevnoj dozi ljekovite tvari.

Tablica 1: Propisani pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije za onečišćenja u novoj ljekovitoj tvari²

Maksimalna dnevna doza	Prag izvještavanja	Prag identifikacije	Prag kvalifikacije
≤2 g	0.05%	0.10% ili 1.0 mg/dan unosa	0.15% ili 1.0 mg/dan unosa
>2 g	0.03%	0.05%	0.05%

Tablica 2: Pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije za razgradne produkte u novom farmaceutskom proizvodu³

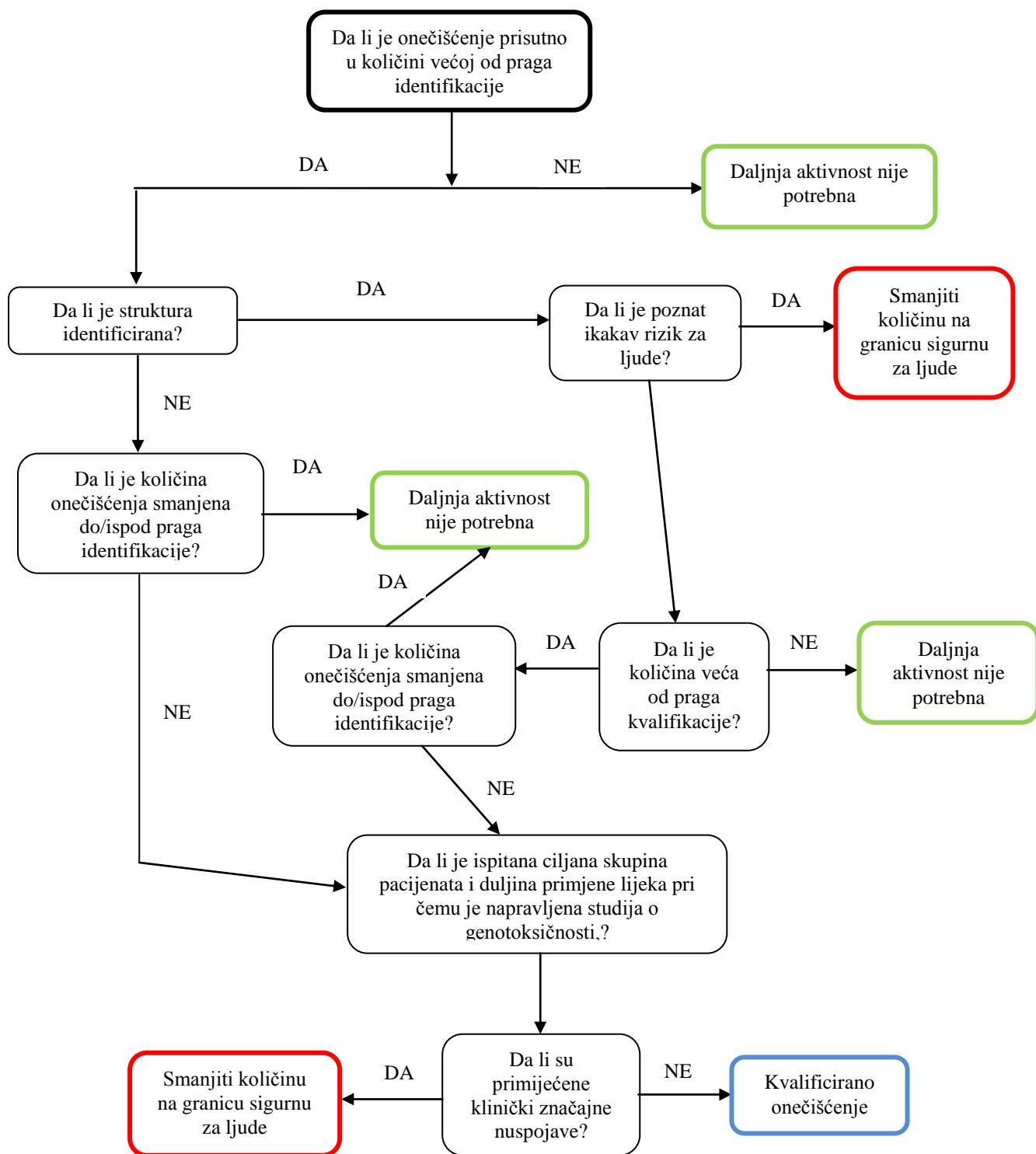
Maksimalna dnevna doza	Prag izvještavanja
≤1 g	0.1%
>1 g	0.05%
Maksimalna dnevna doza	Prag identifikacije
<1 mg	1.0% ili 5μg TDI ^a , što god je niže
1 mg - 10 mg	0.5% ili 20μg TDI ^a , što god je niže
>10 mg – 2 g	0.2% ili 2mg TDI ^a , što god je niže
>2 g	0.10%

Maksimalna dnevna doza	Prag kvalifikacije
< 10 mg	1.0% ili 50µg TDI ^a , što god je niže
10 mg – 100 mg	0.5% ili 200µg TDI ^a , što god je niže
>100 mg – 2 g	0.2% ili 3mg TDI, što god je niže
>2 g	0.15%

^aTDI – ukupan dnevni unos (eng. *Total daily intake*)

Granice niže od propisanih nije potrebno obrazložiti, ali su preporučene kod jako toksičnih onečišćenja, dok je granice koje su više od navdenih potrebno znanstveno obrazložiti i opravdati. Ovakva podjela i izračun odnosi se na organska onečišćenja, bilo da se radi o poznatom ili nepoznatom onečišćenju. Izračun dopuštene količine genotoksičnih onečišćenja u lijeku opisan je u ICH poglavlju M7(R1) dok su granice za ostatna otapala definirana u poglavlju Q3C(R6). Ukoliko su granice za onečišćenja u ljekovitoj tvari i farmaceutskom obliku veće od praga identifikacije, propisanog u ICH smjernicama, slijedi se dijagram odluke (eng. *Decision tree*) za identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja prikazan na Slici 1.

Slika 1: Dijagram odluke za identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja prema ICH smjernicama



3.3.1. Analitičke tehnike za ispitivanje profila čistoće lijeka

Ispitivanje profila čistoće lijeka odnosi se na analitičke postupke kojima je cilj detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje onečišćenja u ljekovitoj tvari i farmaceutskom obliku.⁷ Ovisno o potrebama, onečišćenja se različitim tehnikama mogu izolirati, karakterizirati ili odijeliti. Za izloaciju i/ili odjeljivanje onečišćenja najčešće se koriste tehnike kao što su:⁵

- ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid phase extraction*, SPE)
- ekstrakcija tekuće-tekuće
- supekritična fluidna ekstrakcija (eng. *Solid fluid extraction*, SFE)
- kromatografija na stupcu
- tankoslojna kromatografija (eng. *Thin layer chromatography*, TLC)
- plinska kromatografija (eng. *Gas chromatography*, GC)
- tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High pressure liquid chromatography*, HPLC)
- superkritična fluidna kromatografija (eng. *Super fluid chromatography*, SFC)
- kapilarna elektroforeza (eng. *Capillary electrophoresis*, CE)
- elektron paramagnetska rezonancija (eng. *Electron paramagnetic resonance*, EPR)
- gravimetrijske analize
- UV-Vis spektroskopija (eng. *Ultraviolet and visible spectroscopy*, UV-Vis)
- infracrvena spektroskopija (eng. *Infrared spectroscopy*, IR)

Za karakterizaciju onečišćenja najčešće se koriste tehnike kao što su:⁵

- spektroskopija (IR, Raman)
- masena spektrometrija (eng. *Mass spectrometry*, MS)
- nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija (eng. *Nuclear paramagnetic resonance*, NMR)

Za analizu uzoraka podvrgnutih prisilnoj razgradnji i za ispitivanje stabilnosti proizvoda najčešće se primjenjuju kromatografske tehnike. Prednost kromatografskih tehnika je specifičnost određivanja pojedinačnih analita u smjesi pomoćnih tvari i razgradnih produkata. Ovisno o vrsti analita razvijaju se metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i plinske kromatografije (GC). Primjena plinske kromatografije je ograničena budući da tvari koje se određuju plinskom kromatografijom moraju biti hlapljive i termostabilne.

HPLC metode u većini su slučajeva metode kromatografije obrnutih faza, ali primjenjuje se i kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC), kromatografija normalnih faza i ionska kromatografija.

U novije vrijeme se u puno slučajeva umjesto HPLC metoda koriste metode kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UPLC), zbog poboljšane osjetljivosti, bolje selektivnosti, kraćeg trajanja analize i manje potrošnje otapala.

Za karakterizaciju razgradnih produkata preporuka je koristiti neku od kromatografskih, odnosno separacijskih tehnika u sprezi s MS-om ili NMR-om (LC-MS, LC-MS/MS ili LC-NMR).

3.4. Pregled regulative

Sedamdesetih godina dvadesetog stoljeća javila se zabrinutost da lijekovi tijekom dužeg perioda čuvanja ne mogu održati početnu kvalitetu pa je 1975. farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država (eng. *United States Pharmacopeia*, USP) uvela uputu koja se odnosi na rok čuvanja lijeka. 1984. američka Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) objavljuje prve smjernice za praćenje stabilnosti lijekova, a 1987. postavljaju se zahtjevi za stabilitetnim studijama s ciljem postizanja odgovarajućih uvjeta i rokova čuvanja lijekova. 1993. Međunarodna konferencija o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonization*, ICH) izdala je smjernice za praćenje stabilnosti lijeka i time pokušala objединiti zahtjeve regulatornih agencija za različita tržišta (Europske unije, Japana i Sjedinjenih Američkih Država). 1996. smjernice za ispitivanje stabilnosti farmaceutskih proizvoda izdaje i Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organization*, WHO).⁸

Bez obzira na sve veći broj regulatornih agencija koje daju smjernice o izvođenju studije o prisilnoj razgradnji, nijedna od njih ne daje detaljne, kompletne i jasne upute kako točno provoditi studiju (npr. detaljni uvjeti razgradnje ili vrijeme izloženosti). Ovo vodi do nesigurnosti i razilaženja u tumačenjima između različitih farmaceutskih kompanija, što opet dovodi do različitih pristupa i izvedbi studija prisilne razgradnje.

3.4.1. ICH smjernice

Do danas se pomoću ICH smjernica (eng. *International Conference on Harmonization*, ICH) uspjela postići ujednačenost u mnogim područjima procjene kvalitete lijeka (npr. provođenje stabilitetne studije ili definiranje granica onečišćenja). Što se tiče studije o prisilnoj razgradnji,

ICH naglašava njenu važnost, ali pritom ne daje detaljne upute o njenom provođenju, niti propisuje eksperimentalne uvjete, već daje samo opće smjernice i preporuke. Sljedeća ICH poglavlja obrađuju temu studije o prisilnoj razgradnji:

- ICH Q1A(R2) – *Stability Testing of New Drug Substances and Products*
- ICH Q1B – *Photostability Testing of New Drug Substances and Products*
- ICH Q2(R1) – *Validation of Analytical Procedures: Methodology*
- ICH Q3A(R2) – *Impurities in New Drug Substances*
- ICH Q3B(R2) – *Impurities in New Products*
- ICH Q5C – *Stability testing of Biotechnological/Biological Products*
- M4Q(R1) – *The common Technical Document (CTD): Quality*

3.4.2. ICH Q1A(R2) – ispitivanje stabilnosti novih ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika

Poglavlje Q1A ICH smjernica pod stres test ispitivanjem za ljekovitu tvar podrazumijeva studiju koja se provodi da bi se identificirali mogući produkti razgradnje i na taj način ispitali razgradni putevi i unutarnja stabilnost molekule ljekovite tvari.⁹ Studija je dio razvojne strategije, pri čemu se primjenjuju puno jači eksperimentalni uvjeti od onih koji se primjenjuju kod ubrzanih ispitivanja. Također, stres test ispitivanja imaju značajnu ulogu prilikom validacije analitičke procedure koja je razvijena za tu svrhu.

Poglavlje daje sljedeće preporuke za provedbu studije prisilne razgradnje:⁹

- stres testovi izvode se na jednom kontrolnom broju ljekovite tvari
- stres testovi bi trebali uključivati ispitivanje utjecaja temperature u razmacima od 10°C (npr. 50°C, 60°C..), vlage (npr. 75%RV ili više) gdje je to moguće, oksidacije i fotolize, na ljekovitu tvar
- stres testovi bi trebali ispitati podložnost ljekovite tvari hidrolizi kroz široki raspon pH vrijednosti, kada je u otopini ili suspenziji
- ispitivanje fotostabilnosti bi trebalo biti sastavni dio stres testa, a uvjeti za takva ispitivanja opisani su u poglavlju ICH Q1B.

Kao što je već navedeno, ispitivanje razgradnih produkata koji nastaju kao posljedica stres ispitivanja, korisno je za otkrivanje različitih razgradnih puteva i razvoj i validaciju prikladne analitičke procedure. U nekim slučajevima, detaljno ispitivanje nastalih razgradnih produkata nije potrebno ukoliko se pokaže da oni ne nastaju pod ubrzanim ili dugotrajnim uvjetima čuvanja.⁹

Rezultati studije o prisilnoj razgradnji tj. stres ispitivanja trebala bi biti sastavni dio dokumenata koji se prijavljuju regulatornim tijelima.

U poglavlju Q1A(R2) opisano je samo stres ispitivanje koje se odnosi na ljekovitu tvar, dok se za farmaceutski oblik navodi da se stabilitetna ispitivanja moraju temeljiti na karakteristikama i stabilnosti ljekovite tvari, kao i iskustvima i znanju iz kliničkih ispitivanja formulacije.⁹

3.4.3. ICH Q1B – ispitivanje fotostabilnosti novih ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika

Prema ICH Q1B poglavlju ispitivanje fotostabilnosti za ljekovitu tvar trebalo bi se sastojati od dva dijela, prisilne razgradnje i potvrdnog ispitivanja.^{10,11} Svrha prisilne razgradnje je procjena sveukupne fotoosjetljivosti materijala potrebne za razvoj metode i/ili objašnjenje razgradnih puteva.¹⁰ Ispitivanje može uključivati ljekovitu tvar, samu i/ili u otopini, u svrhu validacije analitičke procedure. Uzorci odabrani za potrebe ispitivanja trebali bi se nalaziti u kemijski inertnoj i prozirnoj ambalaži. Kroz studiju prisilne razgradnje mogu se primijeniti različiti uvjeti ovisno o fotoosjetljivosti ispitivane ljekovite tvari, kao i intenzitetu korištenih izvora svjetla. Za potrebe razvoja i validacije metode, prikladno je smanjiti uvjete izloženosti svjetlu ili prekinuti ispitivanje ukoliko je došlo do jačeg raspada molekule. Za fotostabilne materijale, studija se završava nakon izloženosti određenoj količini svjetla. Osim ovih preporuka tj. uputa, detalji i dizajn eksperimenta ostavljeni su na izbor proizvođaču lijeka, pri čemu korištene količine izloženosti svjetlu moraju biti objašnjene i opravdane.^{10,11} Pod uvjetima prisilne razgradnje može doći do nastanka razgradnih produkata koji vjerojatno neće nastati pod uvjetima korištenim u potvrdnim ispitivanjima. Ukoliko je to slučaj, takvi se produkti ne trebaju dalje ispitivati.^{10,11}

3.4.4. ICH Q2(R1) – Validacija analitičkih procedura

Prema preporuci poglavlja ukoliko standardi onečišćenja ili razgradnog produkta nisu dostupni, specifičnost metode može se prikazati usporedbom rezultata uzoraka koji sadrže onečišćenja ili razgradne produkte s nekom već poznatom i prihvaćenom analitičkom procedurom koja je validirana (npr. farmakopejska metoda).^{11,12} To bi naravno trebalo uključivati uzorke izložene

uvjetima stresa kao što su: svjetlo, temperatura, vlaga, hidroliza u kiselini ili lužini te oksidacija.^{11,12}

3.4.5. ICH Q3A(R2) – Onečišćenja u novim ljekovitim tvarima

Poglavlje navodi da proizvođač koji prijavljuje lijek, u završnom izvještaju mora prikazati sve podatke vezane uz onečišćenja u ljekovitoj tvari. Podaci bi trebali uključivati rezultate svih serija proizvedenih kroz razvojnu fazu, kroz komercijalnu fazu, kao i rezultate stres studije koja služi za identifikaciju onečišćenja koja potencijalno nastaju tijekom čuvanja pod određenim uvjetima.^{2,11}

3.4.6. ICH Q3B(R2) – Onečišćenja u novim farmaceutskim oblicima

Poglavlje navodi da analitičke procedure moraju biti validirane tako da dokažu specifičnost za specificirane i nespecificirane razgradne produkte. Validacija analitičke procedure bi morala uključivati uzorke izložene svjetlu, temperaturi, vlazi, kiseloj i lužnatoj hidrolizi te oksidaciji.^{3,11}

3.4.7. ICH Q5C – Stabilitetna ispitivanja biotehnoloških/bioloških proizvoda

Poglavlje navodi stres studiju kao koristan alat ukoliko se treba potvrditi da li slučajna izloženost uvjetima (npr. prilikom transporta), osim onih propisanih, može imati štetan učinak na proizvod.¹³ Također služi za procjenu kod izbora specifičnih parametara kojima će se određivati stabilnost lijeka. Izlaganje ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika ekstremnim uvjetima pomaže otkriti njihove razgradne puteve i mehanizme, a nastale promjene dalje se prate i kontroliraju pod propisanim uvjetima čuvanja.

Uvjeti za ubrzanu i stres studiju propisanu u prethodnim ICH poglavljima nisu nužno primjenjivi kada su u pitanju biotehnološki ili biološki proizvodi. U tom slučaju uputa je da se uvjeti pažljivo biraju, ovisno o pojedinom slučaju.¹³

3.4.8. M4Q(R1) – Zajednički tehnički dokument: Kvaliteta

Dokument navodi da sve napravljene studije, korišteni protokoli i generirani rezultati trebaju biti obuhvaćeni i sumirani.¹⁴ To uključuje rezultate stres studije, kao i zaključke vezane uz uvjete i vrijeme čuvanja, te korištene analitičke procedure i pripadajuće validacije. Rezultati stabilitetne studije (npr. rezultati nastali nakon provedene prisilne razgradnje i pod stresnim uvjetima) trebaju biti prikazani u prikladnom formatu (tablično, grafički ili pismeno).¹⁴

3.4.9. Svjetska zdravstvena organizacija

Prva, originalna verzija smjernica Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization, WHO*) za stabilitetna ispitivanja, koja je bila primjenjiva na farmaceutske oblike koji sadržavaju već poznate i karakterizirane ljekovite tvari, nije sadržavala nikakve preporuke i zahtjeve vezane uz stres ispitivanja. Nova, važeća verzija "*Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*", oslanja se na ICH smjernice, slijedeći njihove definicije, zahtjeve i preporuke.¹⁵ Bitna razlika od ICH smjernica odnosi se na već poznate i dobro karakterizirane ljekovite tvari, a ona dopušta da se za identifikaciju razgradnih produkata i puteva koristi objavljena i priznata znanstvena literatura. Ukoliko takva literatura nije dostupna provodi se stres ispitivanje.^{15,16} Dodatno, smjernice se referenciraju na poglavlje "*WHO Guidelines for Registration of Fixed-Dose Combination Medicinal Products*",

na dio *"Pharmaceutical Development (or Preformulation) Studies"* koji daje tablicu s uvjetima stresa, prikazanim u Tablici 3.

Tablica 3: Uvjeti stres studije predloženi od strane Svjetske zdravstvene organizacije za razvoj farmaceutskih oblika¹⁷

Parametar stresa	Uvjet	Koncentracija ljekovite tvari	Vrijeme izloženosti
Temperatura	60°C	1:1 s diluentom	1 – 10 dana
Vlaga	75% RV ili više	Čvrsto stanje	1 – 10 dana
Kiselina	0.1 M HCl	2:1 u 0.1 M HCl	1 – 10 dana
Baza	0.1 M NaOH	2:1 u 0.1 M NaOH	1 – 10 dana
Oksidacija	3% H ₂ O ₂	1:1 u 3% H ₂ O ₂	1 – 10 dana
Fotoliza	UV ili fluorescentna lampa; Hg ili Xe lampa	1:1 s diluentom	1 – 10 dana
Metalni ioni (opcionalno)	0.05 M Fe ²⁺ ili Cu ²⁺	1:1 s otopinom metalnih iona	1 – 10 dana

U radnoj verziji smjernica Svjetske zdravstvene organizacije pod nazivom *"Submission of Documentation for a Multisource (Generic) Finished Pharmaceutical Product: Quality Part"*, za sumiranje podataka stabilitetne studije ponovljen je tekst iz ICH smjernica M4Q(R1) – Zajednički tehnički dokument: Kvaliteta. U istom dokumentu stoji dio o stres ispitivanjima koji se poziva na ICH smjernice Q1, i navodi da prisilna razgradnja ljekovite tvari pomaže prilikom identifikacije razgradnih produkata, daje uvid u moguće razgradne puteve i koristi se u validaciji analitičkih procedura, čija je zadaća da budu stabilitetno indikativne. prisilna razgradnja

ljekovite tvari pomaže prilikom identifikacije razgradnih produkata, daje uvid u moguće razgradne puteve i koristi se u validaciji analitičkih procedura, čija je zadaća da budu stabilitetno indikativne.¹⁸ Primjeri tipičnih uvjeta nalaze se u tehničkim izvještajima Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *WHO Technical Report Series*). Cilj stres ispitivanja nije u potpunosti razgraditi ljekovitu tvar već postići razgradnju koja se odražava na smanjenje sadržaja ljekovite tvari u rasponu od oko 10-30%. Na taj način se želi izbjeći stvaranje sekundarnih razgradnih produkata. To treba imati na umu ukoliko se zna da je ljekovita tvar jako osjetljiva na neki od uvjeta stresa. Ako nakon 10 dana izloženosti nekom od uvjeta razgradnja izostane, smatra se da je ljekovita tvar stabilna pri tom uvjetu.^{15,18} Konačni izvještaj trebao bi uključivati sve stres uvjete, opažanja i utjecaj na pojedine parametre (sadržaj i onečišćenja), kao i to da li je postignut balans mase. Fotostabilitetna ispitivanja moraju biti dio stres ispitivanja, a uvjeti su navedeni u ICH poglavlju ICH Q1B – ispitivanja fotostabilnosti novih ljekovitih tvari i farmaceutskih oblika. Također, ako je u farmakopeji za ljekovitu tvar navedeno da se mora zaštititi od svjetla, dovoljno je tako navesti na etiketu, bez da se provede fotostabilitetna studija, pri čemu se potvrdilo da ju spremnik štiti od svjetla.^{15,18} Za fotostabilnost farmaceutskih oblika navodi se isti tekst, uz preporuku da se naprave dodatna stres ispitivanja, ukoliko se to smatra potrebnim (npr. ciklička studija kod polučvrstih proizvoda ili smrzavanje-odmrzavanje kod tekućih proizvoda).

U poglavlju Svjetske zdravstvene organizacije o stabilnosti cjepiva "*WHO Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines*", stres ispitivanja definiraju se kao studija koja se provodi da bi se procijenio utjecaj vanjskih čimbenika na lijek, kao što su npr. svjetlo ili ekstremna temperatura.^{15,19} Ekstremne uvjete nije obavezno ispitati kada je riječ o stabilnosti cjepiva, ali bih ih trebalo razmotriti ako se cjepiva šalju na tržišta gdje su takvi uvjeti realna mogućnost. I kod

cjepiva, stres ispitivanje pomaže u identifikaciji razgradnih produkata i otkrivanju razgradnih puteva lijeka, kao i u validaciji stabilitetno-indikativnih analitičkih procedura. Stres ispitivanje može uključivati izloženost cjepiva temperaturama višim od onih preporučenih za njihovo čuvanje, svjetlu, oksidaciji, smrzavanju i odmrzavanju, te hidrolizi.^{15,19}

3.4.10. Američka agencija za hranu i lijekove

Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) izdala je draft smjernice "*Stability Testing of Drug Substances and Drug Products*" koje su velikim dijelom oslanjaju na ICH smjernice, osim što se dodatno proširuju i na ANDE, kao i smjernice pod nazivom "*Guidance for Industry: ANDAs: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products*". Preporuka koja se odnosi na ANDE, navodi da se stres studija treba napraviti da bi se ustanovila inherentna stabilnost lijekovite tvari i potvrdila prikladnost predloženih analitičkih procedura. Detalji vezani uz studiju ovise o pojedinoj lijekovitoj tvari i vrsti farmaceutskog oblika.^{15,20} Također se navodi da posebno treba razmotriti dio vezan uz promjenu temperature, pogotovo ako se može odnositi na uvjete čuvanja prilikom transporta. To se osobito odnosi na farmaceutske oblike podložne gubitku viskoznosti, razdvajanju faza, taloženju ili agregaciji. Farmaceutski proizvod upakiran u završnu ambalažu trebalo bi izložiti temperaturnim uvjetima i promjenama koje se očekuju kad lijek jednom bude u distribuciji.^{15,20}

Slično se navodi i u dijelu koji se odnosi na inhalatore i nazalne aerosole. Ciklička studija trebala bi se provesti pri jako visokim i niskim temperaturama koje se očekuju prilikom transporta proizvoda. Studija bi se trebala sastojati od 3 ili 4 6-satna ciklusa u danu, između temperature smrzavanja i 40°C (75 – 85% RV), u periodu od 6 tjedana.^{15,20}

U poglavlju za industriju pod nazivom *"Content and format of Investigational New Drug Applications (INDS) for Phase 1 Studies of Drugs, including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products"*, nema zahtjeva ili preporuka koje se odnose na stres ispitivanje¹⁵, ali se spominju u poglavlju pod nazivom *"INDs for Phase 2 i Phase 3 Studies: Chemistry, Manufacturing, and Control Information"*, za fazu 2 i 3 razvoja lijeka. Preporuka za izvođenje stres studije je u ranoj fazi razvoja ljekovite tvari jer studija pomaže u odabiru stabilitetno-indikativnih procedura u kasnijim fazama, prilikom praćenja dugotrajne stabilnosti.^{15,21} Ukoliko stres studija nije provedena u ranijoj fazi trebala bi se provesti u fazi 3 da bi se pokazala inherentna stabilnost ljekovite tvari, otkrili potencijalni razgradni putevi i postigla prikladnost predloženih analitičkih procedura za praćenje stabilnosti. Stres studija trebala bi pokazati stabilnost ljekovite tvari u različitim pH otopinama, u prisutnosti kisika ili svjetla, te pri povišenim razinama temperature i vlage. Ovakva studija, koja je provedena samo na jednoj seriji ljekovite tvari, ne smatra se dijelom kasnije formalno provedene stabilitetne studije. U fazi 3 smjernice se usmjeravaju na stres ispitivanje farmaceutskog oblika i daju sljedeće preporuke: kod određenih farmaceutskih proizvoda stres ispitivanje poslužit će za prepoznavanje potencijalnih promjena u njihovim fizikalnim (razdvajanje faza, taloženje, agregacija..) i/ili kemijskim (degradacija i/ili reakcija među komponentama) karakteristikama. Studija bi trebala uključivati utjecaj visoke temperature i vlage, oksidacije, fotolize.^{15,21}

Zahtjevi za stres ispitivanjima mogu se naći i za pojedine kategorije lijekova, kao npr. u poglavlju *"Fixed Dose Combinations, Co-Packed Drug Products, and Single-Entity Versions of Previously Approved Antiretrovirals for the Treatment of HIV"* gdje je naglasak na interakciji među ljekovitim tvarima, pa se iz tog razloga i preporuča stres ispitivanje, da bi se te interakcije

uočile i identificirali nastali produkti. Također je preporuka da se prilikom stabilitetne studije prate razgradni produkti koji nastaju prilikom proizvodnog procesa ili prilikom čuvanja i skladištenja proizvoda.¹⁵

Od pojedinih kategorija lijekova provođenje stres ispitivanja pod već prethodno spominjanim uvjetima (visoka temperatura, svjetlo, različite pH vrijednosti, svjetlo i kisik) preporuča se i za liposome u poglavlju pod nazivom *"Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation"*, te za koronarne stentove u poglavlju *"Coronary Drug-Eluting Stents – Nonclinical and Clinical Studies"*.¹⁵

U poglavlju pod nazivom *"Botanical Drug Products"* navodi se da se stabilnost botaničke ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika ne bi trebala u potpunosti bazirati samo na praćenju sadržaja aktivnih sastojaka, karakterističnih markera ili biološkog sadržaja, već bi se trebali kontrolirati i produkti iz ostalih kemijskih sastojaka, nastali tijekom skladištenja. Analitička metoda prikladna za detektiranje takvih produkata trebala bi biti razvijena tijekom izloženosti botaničke ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika uvjetima stresa.^{15,22}

U poglavlju, *"Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product"* također se navodi potreba za provođenjem stres studije, u obliku ubrzane stabilnosti ili prisilne razgradnje, a u svrhu utvrđivanja razgradnog profila i usporedbe predloženog biosporedivog proizvoda s referentnim. Uvjeti pod kojima će se provoditi takve usporedive studije kao npr. visoka temperatura, izloženost svjetlu, smrzavanje i odmrzavanje, i agitacija, uzrokuju povećanu razgradnju proizvoda tijekom definiranog vremenskog perioda.^{15,23}

Dodatno, u priručniku "Ureda za regulatorne poslove" navodi se da bi stabilitetno indikativno određivanje sadržaja trebalo mjeriti aktivnu komponentu lijeka, bez interferencije s razgradnim produktima, procesnim onečišćenjima, pomoćnim tvarim ili drugim potencijalnim onečišćenjima. To se postiže stres studijom kojom se ljekovita tvar i/ili farmaceutski oblik izlažu kiseloj i bazičnoj hidrolizi, termičkoj razgradnji, fotolizi, oksidaciji itd. Studija bi trebala pokazati da nastali razgradni produkti i onečišćenja iz pomoćnih tvari ne interferiraju s aktivnom komponentom lijeka.¹⁵

Priručnik također napominje da stres ispitivanja farmaceutskog oblika nisu potrebna u slučaju kada putevi razgradnje i prikladnost analitičkih procedura mogu biti određeni iz sljedećeg: rezultati stres studije ljekovite tvari, dostupnost referentnih materijala za procesna i razgradna onečišćenja, rezultati ubrzane i dugoročne stabilnosti ljekovite tvari, rezultati ubrzane i dugoročne stabilnosti farmaceutskog oblika, dodatni podaci o specifičnosti analitičkih metoda i razgradnim putevima ljekovite tvari pronađeni u literaturnim izvorima.¹⁵

3.4.11. Europska agencija za lijekove

U pojedinim smjernicama Europske agencije za lijekove (eng. *European Medicines Agency*, EMA) vezanim uz stabilitetna i stres ispitivanja, možemo pronaći upute i preporuke navedene u već prethodno spomenutim smjernicama ostalih regulatornih tijela, kao npr. u dokumentu "*Chemistry of New Active Substances*", gdje se navodi da bi svi tipovi stabilitetnih studija (što uključuje prisilnu razgradnju i primjenjene uvjete stresa, kao i buduće uvjete čuvanja), protokoli i dobiveni rezultati, trebali biti obuhvaćeni i sumirani.¹⁵ U smjernicama "*Requirements to the Chemical and Pharmaceutical Quality Documentation Concerning Investigational Medicinal*

Products in Clinical Trials”, za stabilnost i stres studiju navodi se da se podaci dostupni u razvojnoj fazi trebaju sumirati, da je potrebno naglasiti uvjete kritične za stabilnost ljekovite tvari, kao i opisati potencijalne razgradne puteve. Za ljekovite tvari za koje postoji farmakopejska monografija treba potvrditi slaganje s propisanom specifikacijom, dok se kod biljnih pripravaka stres ispitivanja mogu izostaviti, ali uz obrazloženje.^{15,24} Prema smjernicama za biološke medicinske proizvode, *“Requirements for Quality Documentation Concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials”*, preporučeno je napraviti studiju s ubrzanim i stres uvjetima radi boljeg razumijevanja razgradnog profila, kao i zbog opravdanja za potencijalno produljenje roka trajanja proizvoda.^{15,25} U smjernicama za već postojeće ljekovite tvari i farmaceutske oblike, *“Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products”*, navodi se da stres ispitivanja imaju ulogu u određivanju unutanje stabilnosti molekule na način da se odrede njezini razgradni putevi, pomoću kojih se mogu identificirati razgradni produkti i validirati stabilitetno-indikativne analitičke metode. Za ljekovitu tvar nekoliko je mogućih pristupa.^{15,26}

- a. Ukoliko je ljekovita tvar opisana u službenoj farmakopejskoj monografiji (što podrazumijeva Europsku farmakopeju ili farmakopeju članice Europske unije) i razgradni produkti imenovani, nisu potrebni podaci o razgradnim produktima i izvođenje stres ispitivanja.
- b. Ukoliko su dostupni podaci o stres studiji u stručnoj literaturi prihvatljivo je da se oni prilože kao potvrda predloženim razgradnim putevima.
- c. Ukoliko podaci o stres studiji nisu dostupni u stručnoj literaturi, uključujući i službene farmakopeje, stres ispitivanja se moraju provesti.

U istom dokumentu, u dijelu za pakiranja i ambalažu, navodi se da dodatna ispitivanja nezaštićenog farmaceutskog oblika mogu biti korisna kod stres studije, i procjene i izbora odgovarajuće ambalaže, kao i studije provedene u sličnim pakiranjima kao potvrda odabrane ambalaže. Za određene vrste proizvoda, kao npr. transdermalne flastere, u smjernicama "*Quality of Transdermal Patches*", navodi se da bi se kod procjene stabilnosti proizvoda u obzir trebao uzeti i razvojni dio proizvoda, što uključuje testove *in vitro* oslobađanja, prodiranja i prijanjanja u kožu. Faktori rizika za stabilnost proizvoda trebali bi biti razjašnjeni, i definiran protokol za praćenje stabilnosti. Praćenje stabilnosti bi trebalo osigurati da je proizvod izložen prikladnim stresnim i realnim uvjetima čuvanja.^{15,27}

3.4.12. Ostatak svijeta

3.4.12.1. Kanada

Smjernice i zahtjevi za izvođenje stres studije "*Stability Testing of Existing Drug Substances and Products*" istovjetni su onima u ICH smjernicama u poglavlju Q1A(R2).¹⁵

3.4.12.2. Južna Amerika

Smjernice izdane od strane Meksika ne upotrebljavaju izraze stres ispitivanje ili prisilna razgradnja već se više fokusiraju na dugoročne i ubrzane uvjete čuvanja, ali spominju razgradne produkte u dijelu u kojem navode ukoliko nastanu tj. primijećeni su tijekom praćenja stabilnosti lijeka, njihovi limiti ne smiju prijeći zahtjeve postavljene u farmakopeji ujedinjenih meksičkih zemalja. Preporuka je koristiti informacije i iz farmakopeja drugih zemalja o pojedinom lijeku i

primjenjene analitičke procedure koje su nastale u skladu s specifikacijom. Ukoliko informacije o razgradnim produktima ne postoje u farmakopejama, može se smatrati da oni ne predstavljaju opasnost za sigurnost lijeka.¹⁵

Brazilska regulatorna agencija *"The National Health Surveillance Agency"* (ANVISA) najprije je 2008. izadala *"Technical document"* koji po prvi puta opisuje zahtjeve i potrebu za određivanjem razgradnog profila kroz stres studiju. Ovaj dokument 2015. zamijenila je Rezolucija RDC 58/2013, a zatim i trenutno važeća RDC 53/2015, koja za cilj ima postavljanje parametara za identifikaciju i kvalifikaciju razgradnih onečišćenja u lijekovima sa sintetičkim ili polusintetičkim ljekovitim tvarima, koji se klasificiraju kao novi, generički ili slični farmaceutski oblici.²⁸

3.4.12.3. Središnja Amerika i Karibi

Regulativa središnje Amerike pod nazivom *"Pharmaceutical products: Stability Studies of Drugs for Human Use"* koja je primjenjiva za El Salvador, Gvatemalu, Nikaragvu, Kostariku i Honduras navodi da ukoliko se želi postići određeni rok valjanosti, podaci o stabilnosti pri ubrzanim uvjetima moraju pokazati da dobiveni rezultati odgovaraju stabilitetnoj specifikaciji. Smatra se da je došlo do značajnih promjena s lijekom ako se početni sadržaj smanjio ispod donje granice definirane u monografiji proizvoda ili su razgradni produkti narasli iznad dozvoljene granice, definirane monografijom ili od strane proizvođača.¹⁵

3.4.12.4. Afrika

Vijeće za medicinsku kontrolu južne Afrike izdalo je smjernice pod nazivom "*Stability*" u kojima se jasno navodi da su zahtjevi i preporuke sa minimalnim izmjenama usvojene od ICH smjernica Q1A(R2). Jedna od napomena tj. razlika odnosi se na već poznate ljekovite tvari i na referenciranje na stručne literaturne izvore kada se opisuje razgradni put molekule i nastali produkti. Prema smjernicama takve refernce trebaju biti uključene u dokumentaciju prilikom prijave proizvoda, ali sama referenca na farmakopeje ne zadovoljava takav zahtjev.¹⁵

Kenija ima smjernice pod nazivom "*Registration of Drugs: Guidelines to Submission of Applications*" koje su kombinacija ICH, WHO i EMA smjernica. Izdvaja se preporuka za ljekovite tvari kod kojih kada su u čvrstom stanju izložene povišenim temperaturama, npr. od 60-120°C, ili 5-10°C ispod točke taljenja, može doći do razgradnje i nastanka razgradnih produkata, koji se možda neće primjetiti kod blažih ubrzanih uvjeta pa bi ovo upotrijebilo kao tzv. "*worst case*" prilikom razvoja prikladnih analitičkih metoda.¹⁵

3.4.12.5. Južna Azija

Smjernice udruženja nacija južne Azije uglavnom su usmjerene na zahtjeve za stabilitetna ispitivanja farmaceutskih proizvoda, što uključuje generičke proizvode i njegove varijacije.

Singapurske smjernice u poglavlju "*Characterization of Impurities*" nalažu da svaki novi razgradni produkt nastao prilikom dugoročnih, ubrznih ili stresnih uvjeta treba biti obrazložen ili karakteriziran ukoliko je moguće. Također se navodi da su stres ispitivanja nužna za

validaciju analitičkih metoda, farmaceustku formulaciju, identificiranje i praćenje potencijalnih razgradnih onečišćenja tijekom praćenja stabilnosti proizvoda.¹⁵

3.4.12.6. Indija

Indija ima nekoliko smjernica koje obuhvaćaju stabilitetna ispitivanja, dokument pod nazivom *"Requirements and Guidelines for Permission to Import and/or Manufacture New Drugs for Sale or to Undertake Clinical trials"* koji se oslanja na ICH smjernice, i draft smjernice pod nazivom *"Guidance on Approval of Clinical Trials and New Drugs"* i *"Guidance for Industry on Fixed Dose Combinations"* koje zahtijevaju da se se u prijavi proizvoda nalaze podaci o studiji prisline razgradnje. U predloženom dokumentu iz 2016., pod nazivom *"Guidelines on Smiliar Biologics: Regulatory Requirements for Marketing Authorization in India (Quality, Perclinicalstudies and Clinical Trials Requirements)"* navodi da će se za ocjenu sličnosti bioloških proizvoda procjenjivati sličnost njihovih studija pri ubraznim i stresnim uvjetima na način da pokazuju slične razgradne profile.^{15,29}

3.4.12.7. Australija i Novi Zeland

Preporuke i zahtjevi za izvođenje stres studije u australskim smjericama za praćenje stabilnosti novih lijekovitih tvari i farmaceustkih oblika *"Stability Testing of New Drug Substances and Products"* jednaki su onim u ICH smjericama, u poglavlju Q1A(R2). Australska administracija za terapijske proizvode *"Australia's Therapeutics Goods Administration"* usvojila je i ostale ICH smjernice, kao i EMA smjernice za stabilitetna ispitivanja pa su zahtjevi jednaki. Isto vrijedi i za Novi Zeland, osim što je njegova klima hladnija od one australske, što se odražava na razlike u sobnoj temperaturi čuvanja, koja je za Novi Zeland <25°C, a za Australiju <30°C.¹⁵

4. RASPRAVA

4.1. Prisilna razgradnja

Studija prisilne razgradnje najprije se provodi na ljekovitoj tvari, kako bi se prikupilo što više podataka o njenoj fizičko-kemijskoj stabilnosti. Razgradni produkti ljekovite tvari mogu biti posljedica sintetskog puta, primijenjenih uvjeta reakcije sinteze, kvalitete polaznih materijala, kvalitete korištenih otapala, postupaka pročišćavanja i načina čuvanja krajnjeg produkta. Različite soli i polimorfni oblici iste ljekovite tvari mogu imati različita fizičko-kemijska svojstva, a time i različite načine razgradnje. Ugradnjom najstabilnijeg oblika ljekovite tvari u formulaciju direktno se utječe na stabilnost farmaceutskog oblika.

Na stabilnost farmaceutskog oblika može utjecati i odabir pomoćnih tvari. Kompatibilnost ljekovite i pomoćnih tvari ispituje se studijom kompatibilnosti kojom se ocjenjuje utjecaj pojedinačnih pomoćnih tvari na ljekovitu komponentu. Promjenom nekompatibilnih pomoćnih tvari ili uvođenjem pomoćne tvari višeg stupnja kvalitete već se u ranoj fazi razvoja lijeka mogu spriječiti problemi sa stabilnošću i osigurati kvalitetu proizvoda³⁰

Razgradnja ljekovite tvari može biti posljedica proizvodnog procesa farmaceutskog proizvoda pa je pri proizvodnji osjetljivih ljekovitih tvari potrebno kontrolirati pH sredine te izloženost vlazi i temperaturi. Ljekovite tvari osjetljive na oksidaciju zahtijevaju odvijanje proizvodnog procesa u atmosferi inertnog plina.

Prisilna razgradnja provodi se i na farmaceutskom obliku, da bi se utvrdio utjecaj pojačanih tj. ekstremnih uvjeta na stabilnost konačnog proizvoda. Ispituje se stabilnost proizvoda pod utjecajem svjetla, oksidacijskih sredstava, kiseline, lužine i povišene temperature.

Osim pomoćnih tvari u formulaciji i prikladna ambalaža štiti gotove proizvode od razgradnje prilikom izloženosti svjetlu i vlazi.

Uz prisilnu razgradnju kao alat kojim se pokušava predvidjeti stabilnost proizvoda provodi se i ubrzano ispitivanje stabilnosti. Uvjeti za provođenje ubrzanog ispitivanja stabilnosti opisani su u ICH-smjernicama.⁹

Razgradni produkti koji nastanu prisilnom razgradnjom ne moraju nužno nastati i pod kontroliranim uvjetima čuvanja farmaceutskog oblika. Važno je pri tome prepoznati relevantne razgradne produkte koji bi mogli nastati i u realnom životnom vijeku proizvoda, odnosno prilikom dugoročnog ispitivanja stabilnosti proizvoda.

4.2. Početak studije prisilne razgradnje

Prilikom razvoja nove ljekovite tvari ili lijeka jako je važno kada započeti sa stres ispitivanjima. Preporuka FDA smjernica je da to bude u fazi 3 razvoja lijeka. Stres ispitivanja trebaju biti provedena u otopinama različitog pH, pod utjecajem kisika ili svjetla i također pri povišenoj temperaturi ili vlazi. Sva ova ispitivanja provode se na jednoj seriji uzorka. No bez obzira na preporuke, poželjno je ovakva ispitivanja započeti još u ranoj pretkliničkoj ili fazi 1 kliničkih ispitivanja. Na taj način osigurava se dovoljno vremena za identifikaciju svih razgradnih produkata i optimizaciju uvjeta stres studije. Također, dovoljno rano započeta stres ispitivanja omogućuju da se postigne napredak u proizvodnom procesu i pravilno odabere stabilitetno-indikativna analitička procedura.³¹

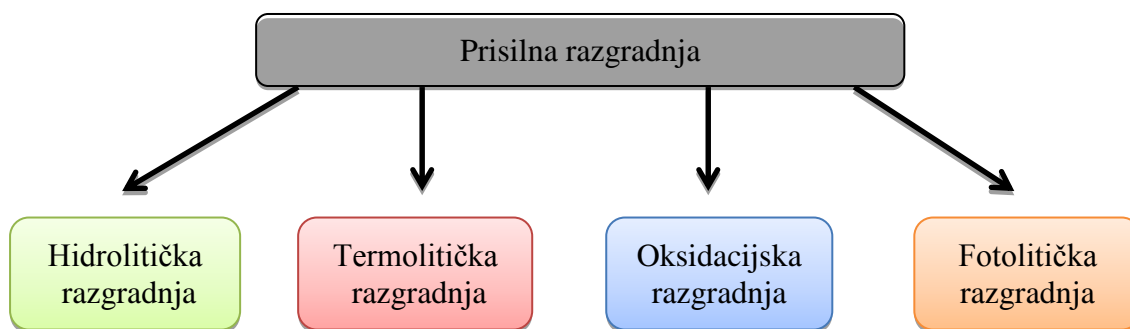
4.3. Granica prisilne razgradnje

Odgovor na ovo pitanje još nije definiran. Prilikom kromatografskog određivanja sadržaja ljekovite tvari (koji je najčešće zastupljen) usvojena je granica od 5% do 20% razgradnje. Mišljenje jednog dijela farmaceutskih znanstvenika je da je 10% razgradnje optimalno prilikom stres ispitivanja malih molekula, za koje je uobičajeno da zahtjev za sadržaj prilikom ispitivanja stabilnosti iznosi 90% od deklarirane oznake farmaceutskog oblika. Nije nužno da prilikom stres studije ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika dođe do razgradnje, u tom slučaju ono može biti prekinuto pod uvjetom da su odabrani uvjeti jači od ubrzanih uvjeta definiranih u stabilitetnom protokolu. Prejaka izloženost uvjetima stresiranja uzorka može dovesti do dodatne tj. sekundarne razgradnje koja ne bi bila primijećena u regularnom praćenju stabilnosti proizvoda. Također, nedovoljna izloženost stresiranim uvjetima može dovesti do izostanka nastajanja razgradnih produkata koji bi praćenjem stabilnosti bili primijećeni.³¹

4.4. Odabir uvjeta prisilne razgradnje

Prisilna razgradnja provodi se radi dobivanja reprezentativnih uzoraka za razvoj stabilitetno-indikativne metode. Izbor razgradnih uvjeta treba biti u skladu s izloženosti uvjetima tijekom redovne proizvodnje, uvjetima skladištenja proizvoda i upotrebe proizvoda.³¹ Uvjeti prisilne razgradnje moraju minimalno uključivati: kiselu i lužnatu hidrolitičku, termičku, fotolitičku i oksidacijsku razgradnju, kao što je ilustrativno prikazano na Slici 2.

Slika 2: Shematski prikaz uvjeta prisilne razgradnje



4.4.1. Odabir koncentracije ljekovite tvari za prisilnu razgradnju

Ovaj kriterij također nije definiran u regulatornim smjernicama. Uobičajena preporuka u praksi je da se istraživanje započne s koncentracijom ljekovite tvari od 1 mg/mL ili u rasponu od 0.1 do 1 mg/mL. Za neka istraživanja preporuka je da se započne s onom koncentracijom ljekovite tvari za koju se očekuje da će biti prisutna u konačnoj formulaciji.^{31,32}

4.5. Uvjeti prisilne razgradnje

4.5.1. Hidroliza

Razgradnja ljekovite tvari koja uključuje reakciju s vodom zove se hidroliza. S obzirom da je voda u značajnoj mjeri prisutna u mnogim ljekovitim tvarima (npr. hidrati) i u velikom broju pomoćnih tvari, uz oksidaciju smatra se najčešćim mehanizmom razgradnje lijeka. Do hidrolize može doći pod utjecajem pH, puferских soli, ionske jakosti, otapala, i nekih drugih faktora koji su sastavni dio formulacije (surfaktanti, kompleksni agensi, pomoćne tvari).

Hidrolitičke reakcije su katalizirane kiselinom ili lužinom. Iz tog razloga svi uvjeti, kiseli, neutralni i lužnati moraju biti zastupljeni u pokusima prisilne razgradnje. Ovo je posebno važno

kada spoj tj. molekula koja se se koristi ima ionizirajuće funkcionalne skupine i može postojati u različitim ionizirajućim stanjima pod odgovarajućim uvjetima. U Tablici 4. opisane su hidrolitičke reakcije koje nastaju ovisno o kemijskim skupinama u molekuli.

Tablica 4: Skupine spojeva koji podliježu hidrolitičkoj razgradnji³³

Funkcionalna skupina	Reakcija razgradnje
Esteri	razgradnja esterske skupine na alkohol i kiselinu
Amidi	razgradnja amidne skupine na kiselinu i amin
Laktami	razgradnja laktamskog prstena na kiselinu i alkohol
Laktoni	razgradnja laktonskog prstena na kiselinu i alkohol
Imidi	razgradnja imidnog prstena
Alkil kloridi	prelazak u odgovarajući alkohol
Azometini	pucanje veze

Za izvođenje pokusa potrebno je pokriti široki pH raspon s definiranim pomacima (npr. 1-2 pH jedinice). Raspon najčešće pokriva područje od pH 1 do pH 13. pH iznad ili ispod ovih vrijednosti ($\text{pH} < 1$ i $\text{pH} > 13$), iako može ubrzati reakciju hidrolize, rijetko se koristi jer također može producirati i dodatne nerealne puteve razgradnje ili razgradne produkte. Za kisele uvjete preporučeno je koristiti klorovodičnu (HCl) ili sumpornu kiselinu (H_2SO_4) u jakosti od 0.1 M do 1 M. Za lužnate uvjete preporučeno je koristiti natrijev (NaOH) ili kalijev hidroksid (KOH) u koncentraciji od 0.1 M do 1 M. Za izvođenje neutralizacije prikladnom kiselinom ili lužinom neposredno prije analize (najčešće HPLC) mišljenja znanstvenika su podijeljena, iako prevladava mišljenje onih koji to ne preporučuju zbog mogućnosti taloženja ili nastanka sekundarnih razgradnih produkata u slučaju neutralizacije.³⁴ Dok oni koji zagovaraju neutralizaciju smatraju

da je ona poželjna zbog izbjegavanja daljnje razgradnje i raspada.

Jedan od potencijalnih problema prilikom izvođenja pokusa u kojima se potiče hidroliza, je topljivost spoja koji je predmet ispitivanja. Male molekule najčešće nisu topljive u vodi u cijelom pH rasponu, u koncentracijama koje se uobičajeno pripremaju za ovakva istraživanja (0.1 - 1 mg/mL).

Rješenje za ovaj problem je korištenje kootapala.³⁴ Dva najčešće korištena kootapala su metanol i acetonitril. Prednost se daje acetonitrilu kao bolje inertnom kootapalu tj. zbog mogućnosti metanola da u nekim slučajevima dodatno potiče razgradnju. Iz tog razloga metanol se koristi s posebnim oprezom, osobito kada spoj koji se ispituje sadrži karboksilnu kiselinu, ester ili amid, jer te grupe mogu reagirati s metanolom (posebno u kiselim uvjetima).³⁴ Najčešće korištena kootapala za hidrolitičku razgradnju navedena su u Tablici 5.

Tablica 5: Organska kootapala koja se koriste u stres testiranjima³⁴

Kiseli pH	Neutralni pH	Lužnati pH
Acetonitril (ACN)	Acetonitril (ACN)	Acetonitril (ACN)
Dimetilsulfoksid (DMSO)	N-metilpirolidinon (primarno za oksidaciju)	Dimetilsulfoksid (DMSO)
Octena kiselina	Metanol	1,2-dimetoksietan
Propionska kiselina		1-metoksi-2-(2-metoksietoksi)etan
Tetrahidrofuran (THF)		p-dioksan
		Metanol

Još jedan faktor je bitan prilikom definiranja pokusa hidrolitičke razgradnje, a to je temperatura. Istraživanja uobičajeno započinju na sobnoj temperaturi, ali ukoliko nema razgradnje primjenjuje

se povišena temperatura (50°C – 70°C), što bi trebalo ubrzati procese hidrolitičke razgradnje u značajnoj mjeri. Više temperature se mogu koristiti, ali nisu preporučene zbog nepredviđenog ponašanja ispitivanog spoja pri takvim uvjetima. Najduži preporučeni period trajanja pokusa je 7 dana, ali i duže vrijeme je dozvoljeno.

Preporuke za uvjete kiselinom ili lužinom kataliziranu hidrolitičku prisilnu razgradnju sumirane su u Tablici 6 za ljekovitu tvar, i Tablici 7 za farmaceutski oblik.

Tablica 6: Preporučeni uvjeti za kiselu ili lužnatu razgradnju ljekovite tvari³⁴

Koncentracija ljekovite tvari	0.1 – 1 mg/mL
pH \approx 1 i pH \approx 13	0.1 M HCl i 0.1 M KOH ili NaOH
pH 2 - 12	Fosfatni pufer, 50 mM; podešavanje pH s HCl ili NaOH/KOH ukoliko je potrebno
Kootapala	Acetonitril (ili prema preporuci iz Tablice 5.)
Temperatura	Sobna temperatura do 70°C
Vrijeme izloženosti	5 – 20% razgradnje do 1 tjedna pri 70°C
Neutralizacija	Nije preporučena; velika vjerojatnost nastanka dodatnih produkata ili sekundarnih reakcija
Spremnici	Kremeni ili borosilikatni stakleni viali s nepropusnim zatvaračima

Tablica 7: Preporučeni uvjeti za kiselu ili bazičnu razgradnju farmaceutskog oblika³⁴

Koncentracija ljekovite tvari	Ovisno o formulaciji
pH raspon	+/- 2 pH jedinice oko ciljane pH vrijednosti
Temperatura	do 70°C
Vrijeme izloženosti	5 – 20% razgradnje ili 1 – 3 tjedna maksimalno, ovisno o roku trajanja

4.5.2. Razgradnja pod utjecajem temperature

Da bi se uzorak razgradio pod utjecajem temperature treba biti izložen dovoljno visokoj temperaturi da dođe do pucanja kovalentne veze, odnosno pirolize. U reakcije razgradnje pod utjecajem temperature ubrajaju se reakcije hidrolize/dehidracije, dekarboksilacije, izomerizacije/epimerizacije, premještanja te vrste polimerizacije.³⁴

Dugoročna razgradnja pod utjecajem povišene temperature može se predvidjeti uz pomoć Arrheniusovog modela. On opisuje ovisnost brzine reakcije razgradnje o temperaturi kojoj je uzorak izložen.³¹ Brzina reakcije određuje se izlaganjem lijekovite tvari u suhom stanju i u otopini povišenim temperaturama u razmaku od po 10 °C (prema preporuci ICH smjernica, poglavlje ICH Q1A(R2)).⁹

$$K=A e^{(-E_a/RT)}$$

K - koeficijent brzine kemijske reakcije

A - faktor frekvencije (npr. frekvencija sudara između reaktanata)

E_a - energija aktivacije (kJ mol^{-1})

R - opća plinska konstanta ($8,3145 \text{ J K mol}^{-1}$)

T - termodinamička temperatura (K)

Kada se dobiveni rezultati prikažu na Arrheniusovom grafu, pri čemu se na y os nanosi $\ln K$ a na os x T^{-1} , iz nagiba pravca može se očitati E_a , a iz odsjeka na osi y $\ln A$.

Povišenom temperaturom ubrzava se reakcija razgradnje, za svakih 10°C otprilike dva puta. Kada se prema Arrheniusovu modelu odredi kinetika reakcije može se kratkotrajnim izlaganjem visokim temperaturama dati predikcija razgradnje koja će se dogoditi na nižim temperaturama kroz duže vrijeme (Tablica 8).

Ovisno o E_a izračunava se vrijeme izlaganja povišenoj temperaturi u kojem će se razgraditi ista količina uzorka koja bi se razgradila kroz 24 mjeseca na temperaturi od 25 °C, što je predviđeni rok trajanja proizvoda (Tablica 8).

Tablica 8: Vrijeme u kojem će se tvari različitih energija aktivacije razgraditi pri povišenoj temperaturi jednako kao pri temperaturi od 25°C tijekom 24 mjeseca³⁴

Temperatura (°C)	Energija aktivacije E_a (kcal/mol)				
	12	17	19.8	25.8	29.8
40	280.8	182.5	146.0	90.1	65.2
50	152.1	79.3	54.9	25.0	14.8
60	86.9	35.8	21.7	7.5	3.7
70	51.0	16.9	9.1	2.4	1.0

Ako je E_a molekule 17 kcal mol⁻¹, razgradnja uzorka čuvanog šest mjeseci na 40 °C jednaka je razgradnji uzorka čuvanog dvije godine na 25 °C. Ako je E_a molekule 25,8 kcal mol⁻¹, razgradnja postignuta čuvanjem uzorka šest mjeseci na 40 °C jednaka je razgradnji u vremenu od čak četiri godine na temperaturi od 25 °C.

Treba napomenuti da je Arrheniusova kinetika bolje primjenjiva kod istraživanja stabilnosti suhih farmaceutskih oblika, uz pretpostavku manje ukupne razgradnje (~ od 5 % do 10 %). Kod

veće razgradnje može se pojaviti i razgradnja drugog stupnja, pa model ne mora dati točne rezultate.³⁴

Za većinu malih molekula razgradnja slijedi iste razgradne mehanizme pri svim temperaturama. Razumljivo je, stoga, da se većina studija za različite male molekule ljekovitih tvari provodi na sličan način zagrijavanjem suhe ljekovite tvari, otopine ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika na temperature od 50 °C do 85 °C.³⁴ Više temperature potiču drugačije razgradne mehanizme. Zagrijavanjem supstancija na temperature od 70 °C do 85 °C i više, povećava se rizik od pojave razgradnih mehanizama i nastajanja razgradnih produkata koji se ne očekuju u realnim uvjetima čuvanja farmaceutskih proizvoda.³⁴ Preporučeni uvjeti za termičku razgradnju pod utjecajem vlage navedeni su u Tablici 9.

Tablica 9: Preporučeni uvjeti za termičku razgradnju pod utjecajem vlage³⁴

Spremnik	Otvoren
Uzorak	Ljekovita tvar: materijal s reprezentativnim sintetičkim putem i fizikalnom formom Farmaceutski oblik: visoke i niske doze konačnog proizvoda
Temperatura	50 - 70°C
Relativna vlaga	Visoka vlaga: 75% ili više Niska vlaga: 20% ili niže
Maksimalno vrijeme izloženosti	Postizanje kinetike koja je ekvivalentna trajanju od 6 mjeseci pri 40°C/75% RV ili više. Za smjernice pogledaj Tablicu 8.

4.5.3. Oksidacija

Oksidacijske reakcije jedan su od dva najčešća mehanizma razgradnje lijekovite tvari. Tri su najbitnija oksidacijska puta kojima dolazi do razgradnje:

- autooksidacija (oksidacija potaknuta radikalom)
- oksidacija potaknuta peroksidom
- oksidacija potaknuta transferom elektrona

Do oksidacije može još doći i prilikom izloženosti drugim oksidacijskim uvjetima (npr. hidroksilni radikali, ozon). U Tablici 10 prikazane su funkcionalne skupine koje podliježu oksidacijskoj razgradnji i razgradni produkti koji pri tome nastaju.

Tablica 10: Funkcionalne skupine koji podliježu oksidacijskoj razgradnji³³

Funkcionalna skupina	Reakcija razgradnje
Tioli	Nastajanje S-oksida i disulfida
Tioeteri	Nastajanje S-oksida
Biciklički i triciklički fenoli	Nastajanje dimera
Polihidroksibenzeni	Nastajanje kinona
Tiazini	Nastajanje S-oksida
Nezasićene skupine	Nastajanje hidroperoksida
Derivati N-izopropiletanolamina	Oksidacija N-izopropiletanolaminske skupine
Derivati indola	Oksidacija skupine N-H

4.5.3.1. Autooksidacija (oksidacija potaknuta radikalom)

Autooksidacija je reakcija nastajanja radikala lijekovite tvari uslijed čega se ona razgrađuje. Može biti potaknuta svjetlom, ubrzana zbog prisustva metalnih iona, pokrenuta pucanjem veze u prisustvu peroksida i nizom drugih reakcija. Često mehanizam autooksidacije nije u potpunosti

razjašnjen i ovisi o tome radi li se o suhom obliku ili se reakcija odvija u otopini. U većini slučajeva kinetika reakcije ne slijedi Arrheniusov model, a osobito se to može reći za reakcije koje se odvijaju u otopinama. Porastom temperature mogu nastati novi razgradni mehanizmi, a može se i smanjiti brzina reakcije. Slijedi zaključak da se kratkotrajnom prisilnom razgradnjom ne mogu u potpunosti predvidjeti dugoročni autooksidacijski mehanizmi.³⁴

U nekim slučajevima sama ljekovita tvar nije podložna reakcijama oksidacije, ali postaje na njih osjetljiva kao dio formulacije. Razlog ove pojave su pomoćne tvari koje sadrže organske hidroperoksidge (ROOH) kao onečišćenja. Ovisno o njihovoj koncentraciji i o osjetljivosti ljekovite tvari onečišćenja pomoćnih tvari mogu biti pokretači reakcije autooksidacije.³⁶ Mogu potaknuti razgradne mehanizme koji se ne očekuju pri realnim uvjetima čuvanja farmaceutskog oblika, pa stoga nije poželjno njihovo nastajanje u velikoj količini.³⁴ Pomoćne tvari koje mogu sadržavati hidroperoksidge su *PEG400*, *Tween 80*, *HPMC*, *PVP*.³⁶

Porast temperature također može potaknuti nastanak dodatnih razgradnih produkata zbog termičke nestabilnosti oksidacijskih međuprodukata, koji se pri nižim temperaturama ne bi razvili.³⁷

Sumnja na autooksidativnu razgradnju spoja koji se ispituje može se potvrditi izlaganjem azonitrilnim spojevima kao što su 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) za ljekovite tvari topljive u organskim otapalima i 4,4'-azobis(4-cijanovalerijanska kiselina) (ACVA) za ljekovite tvari topljive u vodenim otopinama.³⁴ Uvjeti za takve reakcije predloženi su u Tablici 11.

Tablica 11: Preporučeni uvjeti za autooskidaciju³⁴

Izvor autooskidacije	Azonitrili AIBN ili ACVA
Koncentracija ljekovite tvari	0.1 – 1 mg/mL
Koncentracija oksidansa	5- 20 mol% koncentracije ljekovite tvari
Otapalo	Acetonitril/voda/metanol
Temperatura	40 – 60°C
Vrijeme izloženosti	5 – 20% razgradnje ili maksimalno 7 dana

Za 2,2'-azobisizobutironitril (AIBN), koji je topljiv u organskim otapalima preporuka je koristiti omjer otapala acetonitril (50% ili više), metanol (10%) i vodu (0 – 25%). Za 4,4'-azobis(4-cijanovalerijanska kiselina) (ACVA) koja je topljiva u vodenim otopinama taj omjer je voda (50% ili više), metanol (10%) i acetonitril (<40%).³⁴ Važan faktor za reakcije s ovim spojevima je također i temperatura koja ne bi trebala biti viša od 40 °C, što je dovoljno za razlaganje azonitrilnih spojeva na peroksidne radikale, pri čemu ne nastaje velika količina aloksilnih i hidroksilnih radikala iz eventualno prisutnih peroksida.³⁴

Cilj testova autooskidacijske razgradnje je:

- a) predvidjeti osjetljivost ljekovite tvari/farmaceutskog obilika na autooskidaciju
- b) uočiti oksidacijske mehanizme
- c) potaknuti nastanak oksidacijskih onečišćenja u svrhu testiranja selektivnosti analitičke metode.

4.5.3.2. Oksidacija potaknuta peroksidom

Izloženost peroksidima također može izazvati reakciju oksidacije u spojevima koji se ispituju. Peroksidi se mogu pronaći u različitim količinama u raznim pomoćnim tvarima (npr. polisorbitat, polietilen glikol, povidon i hidroksipropil celuloza). Primijećeno je da ponekad s vremenom može doći do porasta tih količina zbog autooksidacijskih procesa. Iz tog razloga bitno je provjeriti kako lijekovita tvar reagira na perkoside, a to se najčešće izvodi na način da se ona otopi u razrijeđenoj vodenoj otopini vodikovog peroksida, npr. 0.3 - 3% vodikovog peroksida. Pri tome je preporuka kontrolirati vrijednost pH kako bi se osiguralo da su sva protonirana stanja lijekovite tvari testirana. Također pokus bi trebalo izvoditi pri sobnoj temperaturi jer pri višim temperaturama ($>30^{\circ}\text{C}$), budući da je kisik-kisik slaba veza, može doći do njenog cijepanja i nastanka hidroksilnih radikala koji mogu prilično jako oksidirati većinu lijekovitih tvari, ali na način da dolazi do nepredviđene i nerealne razgradnje. Preporuka je izloženost peroksidu izvoditi pri temperaturi $\leq 30^{\circ}\text{C}$ u mraku, od 1 do 7 dana. Takvi uvjeti omogućuju da dođe do očekivane oksidacijske razgradnje.³⁴ Preporučeni uvjeti za razgradnju vodikovim peroksidom nalaze se u Tablici 12.

Tablica 12: Preporučeni uvjeti za oksidaciju hidroksidovim peroksidom³⁴

Koncentracija vodikovog peroksida	0.3 – 3%
Koncentracija lijekovite tvari	0.1 – 1 mg/mL
Temperatura	Sobna temperatura – 30°C
Vrijeme izloženosti	5 – 20% razgradnje ili maksimalno 7 dana

4.5.3.3. Oksidacija potaknuta transferom elektrona

Elektron-transfer mehanizmi (npr. oni koji uključuju premještanje elektrona s funkcionalne skupine unutar molekule ljekovite tvari) mogu nastati kao posljedica vezanja ili reakcije s metalima. Sklonost molekule ovoj vrsti oksidacijske razgradnje može se ispitati tretiranjem s kompleksima željeza(III) ili bakra(II). Reakcija se odvija prijenosom elektrona s aktivne tvari na metal koji se reducira, aktivna tvar prelazi u nestabilni kation koji reagira s kisikom i na taj način se potiče oksidacijska razgradnja. Bakar (II) i željezo (III) koriste se pri koncentraciji od 1-5 mM, kroz jedan dan, za procjenu navedenog oksidacijskog ponašanja.³⁴ U Tablici 13 nalaze se preporučeni uvjeti za reakcije s prijelaznim metalima.

Tablica 13: Preporučeni uvjeti za oksidaciju s prijelaznim metalima³⁴

Metal	Cu(II) npr. CuCl ₂ ili CuSO ₄ Fe(III) npr. FeCl ₃ ili Fe ₂ (SO ₄) ₃
Koncentracija metala	1 mM
Koncentracija ljekovite tvari	0.1 – 1 mg/mL
Temperatura	30 - 40°C
Vrijeme izloženosti	5 – 20% razgradnje ili maksimalno 1 dan

4.5.4. Razgradnja pod utjecajem svjetla (fotoliza)

Fotolitička razgradnja uzrokovana je izloženošću ultraljubičastom (UV) ili vidljivom svjetlu (Vis) u rasponu valnih duljina od 300 - 800 nm. Izloženost zračenju na valnoj duljini ispod 300 nm nije potrebna jer nije vjerojatno da ju lijekovi kroz svoj životni ciklus iskuse.

Vanjsko danje svjetlo koje emitira sunce obuhvaća:

- ultraljubičasto svjetlo : UV-A (320 nm do 400 nm) i UV-B (280 nm do 320 nm)
- vidljivo svjetlo (400 nm do 800 nm)

Osim vanjskom sunčevom svjetlu proizvod može biti izložen i svjetlu unutar zatvorenog prostora. Ono obuhvaća sunčevo svjetlo filtrirano kroz staklene prozore i svjetlo umjetnih izvora (bijelo fluorescentno svjetlo i bliski dio UV spektralnih valnih duljina).³⁴

Prema fotokemijskim zakonima da bi došlo do fotolitičke razgradnje mora najprije doći do apsorpcije zračenja od strane molekule što znači ili od ljekovite tvari ili od drugih komponenti u farmaceutskom obliku. To znači da je fotolitička razgradnja ovisna o količini zračenja kojem je molekula izložena i količini zračenja koje je molekula apsorbirala. Važno je naglasiti da do fotolitičke razgradnje može doći čak i ako molekula ljekovite tvari ne apsorbira zračenje u UV ili vidljivom području. To je moguće samo u slučaju kada u formulaciji postoji dodatni posrednik (npr. pomoćna tvar ili onečišćenje) koje omogućuje apsorpciju. Funkcionalne skupine koje su osobito osjetljive na svjetlo te reakcije njihove razgradnje izdvojene su u Tablici 14.

Tablica 14: Skupine spojeva koji podliježu razgradnji pod utjecajem svjetla³³

Funkcionalna skupina	Reakcija razgradnje
Olefini	izomerna konverzija s ili bez fotociklizacije nastajanje epoksida, nastajanje hidroperoksida, dimerizacija
Ariloctena kiselina	dekarboksilacija
Aromatska nitro-skupina	redukcija u nitrozo-skupinu i oksidacija prstena
Arilhalo-derivati	dehalogenacija
<i>N</i> -alkil-derivati	<i>N</i> -dealkilacija
Benzofenoni	nastajanje radikala
<i>N</i> -oksidi	nastajanje oksaziridina

ICH smjernice propisuju fotostabilnost kao sastavni parametar praćenja stabilnosti proizvoda, lijekovitih tvari i farmaceutskih oblika. Ispitivanje fotostabilnosti razlikuje potvrdnu studiju i prisilnu razgradnju. Potvrdnom studijom se prema standardiziranim uvjetima utvrđuje fotostabilnost proizvoda čiji rezultati upućuju na dugoročnu stabilnost.

Prema ICH smjernicama ispitivanje stabilnosti pod utjecajem svjetla provodi se prema Opciji 1 i Opciji 2.¹⁰ Opcija 1 simulira uvjete sunčevog svjetla uz pomoć lampe koja kombinira ultraljubičasti i vidljivi dio spektra. Koriste se lampe od metalnih halida ili ksenonova lampa. Uzorci su istovremeno izloženi UV-A i UB-A zračenju te vidljivom zračenju (420 nm do 800 nm). Opcija 2 simulira osvjetljenje unutar zatvorenog prostora. Umjetno se osvjetljenje sastoji od hladnog bijelog fluorescentnog svjetla i bliskog UV svjetla. Najčešće se koristi ksenonova lampa. Produkti nastali fotolitičkom razgradnjom tijekom prisilne razgradnje nisu uvijek primijećeni tijekom izloženosti potvrdnoj studiji, zbog ovisnosti o različitim faktorima kao što su, ako se radi o samoj lijekovitoj tvari, forma u kojoj se ona nalazi (amorfna, kristalna ili polimorfna) ukoliko se radi o otopini, koncentracija djelatne tvari ili otapalo u kojem je otopljena, ili fizička svojstva lijekovite tvari. Razlike u razgradnji između potvrdne studije i prisilne razgradnje mogu nastati zbog korištenja različitih izvora zračenja, različite količine zračenja, različitih temperatura ili vremena izloženosti. Iz tog razloga važno je obje studije izvoditi s istim izvorom zračenja i bez dodatnih različitosti.³⁴

Budući da se preporučena minimalna izloženost zračenju prema ICH (1.2 million luxa/h za vidljivo zračenje i 200W h/m² za UV) ne odnosi na studiju o prisilnoj razgradnji, količina zračenja i duljina izloženosti potrebne za takve pokuse samim time nisu strogo definirane. Postoji preporuka kako

izloženost u takvim pokusima treba biti minimalno 2 puta veća od one propisane ICH smjernicama, a najčešće se spominju i koriste vrijednosti od 2 do 5 puta veće, koje su dovoljne da dođe do razgradnje od 10-20% za većinu slučajeva jer više od toga nije potrebno ni poželjno. Sažetak preporuka za provođenje fotolitičke stres studije naveden je u Tablici 15.

Tablica 15: Preporučeni uvjeti za fotolitičku razgradnju³⁴

Izloženost vidljivom svjetlu	Min 2 puta veća od ICH preporučene od 1.2 million luxa/h
Izloženost UV svjetlu	Min 2 puta veća od ICH preporučene od 200W h/m ²
Ljekovita tvar u otopini	Opcionalno za čvrste farmaceutske oblike Preporučeno za injekcije, suspenzije ili druge tekuće farmaceutske oblike
Ljekovita tvar u čvrstom stanju	Tanki sloj <1 mm
Farmaceutski oblik u čvrstom stanju	Tablete bi trebale biti posložene u jedan sloj
Izvor svjetla	ICH Opcija 1 ili 2 (koristiti isti izvor svjetla za prisilnu razgradnju i potvrdnu studiju)
Kontrola svjetlosti	Pokriti spremnik s nepropusnim prekrivačem za svjetlo npr. aluminjska folija
Spremnik	Spremnik od kvarcnog ili borosilikatnog stakla sa poznatom vrijednošću propusnosti svjetla
Vrijeme izloženosti	Ovisno o intenzitetu svjetla

Ukoliko uzorak izložen svjetlu ne mijenja izgled, bistrinu, boju, sadržaj, te nije primijećena razgradnja i nastajanje razgradnih produkata, može se zaključiti da je molekula fotostabilna, odnosno u slučaju ispitivanja pakiranog proizvoda da pakiranje dobro štiti uzorak od svjetla.

4.6. Razvoj stabilitetno-indikativne metode za određivanje sadržaja lijekovite tvari

Prema defniciji FDA smjernica, stabilitetno-indikativna metoda je validirana analitička procedura koja može detektirati promjene u vremenu u kemijskim, fizikalnim ili mikrobiološkim svojstvima lijekovite tvari i farmaceutskog oblika, i dovoljno je specifična da se sadržaji lijekovite tvari, razgradnih produkata i ostalih komponenata mogu točno odrediti, bez interferencija.²⁰ Unatoč tome što su stabilitetno-indikativna metoda za određivanje sadržaja i zahtjevi koji pritom moraju biti ispunjeni definirani u regulatornim smjernicama, osnovni koraci za razvoj i validaciju takve metode nisu propisani.

Dalje u tekstu preporučeni su koraci za razvoj stabilitetno-indikativne metode (SIM) koja zadovoljava regulatorne zahtjeve. Preporuke su temeljene na iskustvima brojnih analitičkih znanstvenika i odnose se na SIM određivanja sadržaja pomoću HPLC tehnike.

4.6.1. Korak I - proučavanje strukture lijekovite tvari

Proučavanjem strukture i funkcionalnih skupina lijekovite tvari tj. njene molekule može se dobiti puno informacija o mogućoj razgradnji, ovisno o uvjetu kojem je izložena. U većini slučajeva, ovisno o funkcionalnim skupinama može se pretpostaviti kojoj razgradnji će biti podložna sama molekula:³²

- amidi, esteri, laktami, laktoni - podložni hidrolizi
- tioli, tioeteri itd. – podložni oksidaciji
- alefini, aril halo derivati, N-oksidi - podložni fotolizi

Mnogi novi spojevi mogu se zbog istih funkcionalnih skupina svrstati u već postojeću grupu srodnih spojeva, pri čemu se olakšava njihovo istraživanje. Ali ovakav pristup ipak treba uzeti s rezervom i detaljno provjeriti svojstva koja bi upućivala na bitne razlike u odnosu na već poznate i otkrivene spojeve.

4.6.2. Korak II - informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima lijekovite tvari

Prije samog razvoja SIM metode važno je najprije utvrditi fizikalno-kemijska svojstva ispitivanog spoja. To su na primjer pKa vrijednost, log P, topljivost, maksimum valne duljine apsorpcije. Poznavanje pKa vrijednosti je važno jer do većine promjena u retenciji dolazi pri pH vrijednostima koje su unutar ± 1.5 jedinica pKa vrijednosti. Ionizacijska vrijednost i koeficijent raspodjele također su važni prilikom odabira pufera za mobilnu fazu i uvid u potencijalno razdvajanje komponenti na određenim stacionarnim fazama. pKa i logP vrijednosti mogu se odrediti praktično ili se teoretski izračunati pomoću različitih programa.

Da bi se provela analiza lijekovite tvari i njezinih razgradnih produkata nužno je da su sve komponente topljive o odabranom otapalu, što znači da su podaci o njihovoj topljivosti u vodenim, organskim i uobičajenim otapalima za HPLC analize od iznimne važnosti i koristi prilikom odabira otapala za pripremu uzoraka i mobilnu fazu. Dodatno, prilikom HPLC analize potrebno je poznavati maksimalnu valnu duljinu pri kojoj je apsorpcija svih komponenti najveća.

Poznavati sve navedene parametre od iznimne je važnosti, a također i zahtjev, ukoliko se razvija HPLC metoda. Kada su razgradni produkti neke lijekovite tvari poznati i dostupni za analizu, onda je taj dio posla lakši, ali kada razgradni produkti i putevi razgradnje lijekovite tvari nisu poznati,

onda to može zadavati velike poteškoće u razvoju metode. U tom slučaju prijedlog je izložiti ljekovitu tvar uvjetima prisilne razgradnje i pratiti promjene i reakcije, u pojedinačnim otopinama, i u smjesi svih otopina. To može dati neke naznake u pomacima valne duljine i pronalaženju optimalne valne duljine za analizu.³²

4.6.3. Korak III – studija o prisilnoj razgradnji

Kao što je spomenuto u prethodnom koraku, sljedeći korak bila bi prisilna razgradnja tj. izlaganje ljekovite tvari uvjetima stresa. Predloženi uvjeti stresa mogu se naći u ICH poglavlju Q1A(R2). Predlaže se:⁹

- povećanje temperature od 10°C u odnosu na temperaturu pri ubrzanim uvjetima (npr. 50°C, 60°C..)
- izlaganje vlazi gdje god je to primjenjivo (npr. 75% i više)
- hidroliza u što širem pH području
- oksidacija
- fotoliza

Prilikom izvedbe pokusa preporuka je pripremiti 4 uzorka za svaki uvjet razgradnje tj. otopinu slijepe probe pri uobičajenim uvjetima, otopinu slijepe probe izloženu nekom od stresnih uvjeta, i tako isto i za ljekovitu tvar, pod istim odabranim uvjetom stresa i pri standardnim tj. dugoročnim uvjetima. Također, predlaže se različito vrijeme trajanja reakcija da bi se dobilo što više podataka i potencijalno korisnih informacija o stabilnosti proizvoda. Najčešće se predlaže da se za početnu koncentraciju uzme 1 mg/mL i da se pripremi dovoljna količina uzorka, ukoliko bude potrebe za detaljnijim razvojem metode.³²

4.6.4. Korak IV – preliminarna razvojna studija

U ovom dijelu razvoja metode najprije se gleda koliko i koji su razgradni produkti nastali pod različitim uvjetima razgradnje. Prijedlog je da se sa separacijom započne na najčešće korištenoj stacionarnoj fazi kod HPLC analiza, obrnuto faznim kolonama punjenim silika gelom vezanim za oktadecilnu skupinu (npr. C18). Za početnu mobilnu fazu trebala bi se odabrati kombinacija metanol/voda ili acetonitril/voda. Upotreba pufera u ovoj fazi nije preporučena ukoliko se razvoj nastavi na preparativnoj tekućinskoj kromatografiji ili tekćinskoj kromatografiji u sprezi s masenim detektorom. Poželjno je krenuti s omjerom 50:50 pa prema potrebi raditi izmjene jer je cilj dobiti pik ljekovite tvari negdje u srednjem dijelu kromatograma kako bi se kasnije postiglo bolje razdvajanje potencijalnih razgradnih produkata. Samim tim dobro je za početak imati nešto duže vrijeme eluiranja pikova da bi se uvjerali kako su se svi nastali produkti pojavili na kromatogramu. Valna duljina detekcije podešava se kao što je opisano u koraku II, ovisno o karakteristikama same molekule i njenih potencijalnih onečišćenja te njihovom ponašanju ovisno o uvjetima razgradnje kojima su bili izloženi. Volumen injektiranja i protok kroz kolonu podešavaju se ovisno o duljini kolone i preporukama proizvođača. Nakon što se podese osnovni uvjeti analize trebalo bi pratiti promjene u svim uzorcima izloženim stresnim uvjetima kroz različita vremenska razdoblja, i naravno napraviti usporedbu s otopinama slijepe probe u istim tim uvjetima. Na taj način se može uvidjeti da li potencijalni pad u sadržaju glavne komponente prati porast nastalih razgradnih produkata. To se naravno ne događa u svim slučajevima jer često molekula lijeka i njeni razgradni produkti imaju različito vrijeme razgradnje. Može se dogoditi da se na kromatogramu razgradni produkti uopće ne pojave iako su nastali pri stresnim uvjetima. To upućuje na nastanak produkata koji nisu kromofori ili je riječ o jako malim molekulama. U

tom slučaju analiza na više valnih duljina ili upotreba LC-MS tehnike postaje nužna. Ponekad nastali produkti nisu topljivi u reakcijskoj otopini pa se u tom slučaju traži otapalo u kojem bi mogli biti topljivi i potvrđeni HPLC metodom.³²

4.6.5. Korak V – optimizacija razvojne metode

Za daljnji razvoj metode trebalo bi popisati sve nastale razgradne produkte i njihova retencijska, te relativna retencijska vremena, za svaki uvjet razgradnje. Ukoliko produkti imaju veoma slična retencijska ili relativna retencijska vremena, pomoću UV spektra ili LC-MS tehnike trebalo bi potvrditi da li se radi o istim ili različitim produktima. U svakom slučaju, potvrda pomoću UV spektra ili masenog detektora je dobrodošla jer se može dogoditi da se neki produkti ili glavna komponenta zamijene u različitim uvjetima pri čemu dolazi do prelaska iz jedne u drugu molekulu. Takve bliske spojeve koji izlaze blizu po retencijskom vremenu, a navedenim načinima je potvrđeno da su različiti, potrebno je prilagodbom kromatografskih uvjeta što bolje razdvojiti. Na kraju se pripremi smjesa reakcijskih otopina da bi se potvrdila rezolucija među svim nastalim produktima. U smjesu nije preporučljivo staviti sve reakcijske otopine dobivene pri različitim uvjetima, i u različitim vremenskim periodima, jer bi to dodatno kompliciralo razdvajanje i unijelo puno nejasnoća. Prijedlog je da se kombiniraju one otopine u kojima su nastali različiti produkti, u dovoljnim količinama. Potrebno je potvrditi da je rezolucija dobivena u smjesi slična onoj dobivenoj u pojedinačnim otopinama. Ovo je jako važno jer se na taj način potvrđuje da nije došlo do nikakvih dodatnih promjena kada se pomiješaju reakcijske otopine sa različitim pH i medijem. Da bi se dobilo što bolje razdvajanje pikova koji izlaze jako blizu na kromatogramu ili koeluiraju, mogu se optimirati različiti parametri metode, kao što su omjer

sastavnica mobilne faze (ukoliko se radi o gradijentnoj metodi, što je najčešći slučaj), gradijent, pH, protok, temperatura, otapalo, kolona (dimenzije ili punjenje).³²

4.6.6. Korak VI – identifikacija i karakterizacija nastalih razgradnih produkata i priprema standarada

Prije validacije SIM metode potrebno je identificirati nastale razgradne produkte i nabaviti njihove standarde, ukoliko je to moguće. Na taj način se određuju specifičnost i selektivnost SIM metode. Da bi se razgradni produkti identificirali oni se najprije izoliraju, a zatim se njihova struktura određuje nekom od spektralnih (MS, NMR, IR) ili elementarnih analiza. Kad u reakcijskim otopinama nastane više razgradnih produkata onda ovaj način nije praktičan tj. dugotrajan je, pa se iz tog razloga najčešće koristi neka kombinacija tehnika, kao na primjer LC-MS ili LC-MS-MS gdje se istovremeno može odrediti struktura nepoznatih produkata.

Standarde razgradnih produkata najsigurnije je nabaviti komercijalnim putem, no ako to nije moguće tj. ako komercijalno nisu dostupni, onda se produkti moraju ili izolirati iz reakcijske smjese ili sintetizirati u laboratoriju. Da bi se razgradni produkt izolirao potrebno je naći uvjet, odnosno reakcijsku otopinu gdje on selektivno nastaje tj. jedini je prisutan u smjesi. Ukoliko dođe do njegove kristalizacije po završetku reakcije to je najjednostavniji način da ga se izolira. Ima naravno i drugih načina, kao što su liofilizacija reakcijske smjese, ekstrakcija nakon sušenja smrzavanjem, ili ekstrakcija nakon zakiseljavanja, neutralizacije ili prevođenja u lužinu, ovisno o početnom pH, ali se kod ovog posljednjeg načina mora paziti da se produkt dodatno ne razgrađuje promjenom pH vrijednosti. Ako produkt nije jedini prisutan u smjesi onda ga se može izolirati ekstrakcijom na bazi selektivne topljivosti, preparativnom TLC ili HPLC tehnikom. Ako

se je produkt prethodno identificiran pomoću LC-MS ili LC-NMR tehnike, on se može sintetizirati, karakterizirati i potvrditi cijepanjem degradiranog uzorka (dodavanjem produkta u uzorak). Ukoliko je moguće, ovaj način je bolji jer je pouzdaniji, precizniji, češće je brži, i mogu se dobiti željene i dovoljne količine produkta.³²

4.6.7. Korak VII – validacija SIM metode za određivanje sadržaja

Zahtjevi za validaciju metode nalaze se u smjernicama svih većih regulatornih tijela (ICH, FDA, USP). No za razliku od stres studije, za koju te smjernice ili ne postoje, ili su dosta općenite i ne daju dovoljno detalja za njezino eksperimentalno provođenje, smjernice za validaciju metode dosta su jasno određene. Nema detaljnih uputa o njenom provođenju, ali su ti koraci dosada već jako dobro definirani zbog velike količine provedenih validacija različitih vrsta metoda i zahtjeva regulatornih tijela koji moraju biti ispunjeni.

Dvije su velike faze kod provedbe validacije SIM metode za određivanje sadržaja ljekovite tvari. Prva se odnosi na rani razvoj prilikom kojeg je ljekovita tvar izložena prisilnoj razgradnji te se metoda temelji na dobivenim rezultatima tj. razgradnom ponašanju ljekovite tvari. Najbitnije u ovoj fazi je postići dobru specifičnost i selektivnost metode, i nakon toga naravno odraditi ostale validacijske parametre (linearnost, točnost, preciznost, radno područje metode, robusnost..). Limit detekcije i kvantifikacije razgradnih produkata također se određuju u ovom koraku, da bi se mogao odrediti balans mase. Ovako razvijena i validirana metoda služi za praćenje stabilnosti ljekovite tvari kroz definiran vremenski period.

U drugoj fazi, u razvoju farmaceutskih oblika, ukoliko se koristi već validirana SIM metoda za

određivanje sadržaja korištene ljekovite tvari, potrebno je pokazati da su prethodno validirani parametri primjenjivi i prikladni u prisutnosti pomoćnih tvari ili drugih formulacijskih komponenti. Kritične validacijske parametre, kao što su specifičnost/ selektivnost, točnost ili preciznost, trebalo bi revalidirati. Ukoliko se SIM metoda razvija izravno za formulaciju, bez da se prethodno promatrao put razgradnje ljekovite tvari, potrebno je odraditi sve validacijske parametre. Specifičnost i selektivnost metode nisu toliko zahtjevan zadatak ako se poznaje mehanizam razgradnje ljekovite tvari te ako su standardi nastalih razgradnih produkata dostupni. U tom slučaju bitno je postići razdvajanje nastalih komponenti i ljekovite tvari kao što je već spomenuto u prethodnim poglavljima.

4.6.8. Kritični parametri vezani uz razvoj i validaciju SIM metoda

4.6.8.1. Definicija i razlika specifičnosti i selektivnosti metode

Ova dva termina često se zamjenjuju jedan drugim, pa kad se za metodu navede da je stabilitetno-indikativna, trebalo bi definirati da li se radi specifično stabilitetno-indikativnoj ili selektivno stabilitetno-indikativnoj metodi, budući da su to dvije različite metode. Specifično stabilitetno indikativna metoda se definira kao metoda koja je u mogućnosti nedvosmisleno odrediti sadržaj ljekovite tvari u prisutnosti svih razgradnih produkata, pomoćnih tvari i ostalih dodanih komponenti koje su očekivane u farmaceutskom obliku. Selektivno stabilitetna metoda se definira kao metoda koja je u mogućnosti nedvosmisleno odrediti ljekovitu tvar i sve razgradne produkte u prisutnosti pomoćnih tvari i ostalih dodanih komponenti čija je prisutnost očekivana u formulaciji. Prema ovim definicijama selektivno stabilitetno-indikativna metoda je

procedura koja je selektivna prema ljekovitoj tvari, kao i prema razgradnim produktima (odvaja ih kvalitativno) i također specifična prema svim komponentama (određuje ih kvantitativno).³²

4.6.8.2. Ima li specifično stabilitetno-indikativna metoda svrhu i je li je regulatorno prihvatljiva?

S obzirom na definicije iz prethodnog poglavlja može se zaključiti da je selektivno stabilitetno-indikativna metoda ona koja u puno većoj mjeri zadovoljava ICH i zahtjeve ostalih regulatornih smjernica. U svakom slučaju, njen izbor se preferira prilikom razvoja novog lijeka dok kod onih već razvijenih, u obzir može doći i specifično stabilitetno-indikativna metoda. Iz tog razloga se u farmakopejama i dalje mogu naći titrimetrijske i spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja gotovih lijekova jer se onečišćenja tj. razgradni produkti određuju odvojeno i imaju pod kontrolom.

Kao odgovor na pitanje iz poglavlja, specifično stabilitetno-indikativna metoda koristi se ponekad za stabilitetna ispitivanja (koja su uslijedila nakon odobrenja lijeka), ili analizu uzoraka vraćenih s tržišta. Uvjet je naravno da takva metoda u ovim slučajevima daje iste rezultate kao i selektivna metoda, a razlog korištenja je jednostavnija i jeftinija primjena. Također, takve metode se koriste na tržištima gdje nema regulatornih zahtjeva za selektivnom metodom. Ali, u svakom slučaju, prednost se daje specifičnim metodama za koje se napravila usporedba sa selektivnom metodom gdje su dobiveni isti rezultati.³²

4.6.8.3. Je li je nužno koristiti stres ispitivanja za razvoj stabilitetno indikativne metode?

Prilikom stres ispitivanja moguć je nastanak velikog broja razgradnih produkata, nekad samo pri jednom uvjetu stresa. Zato je ponekad jako teško razviti selektivno stabilitetno-indikativnu metodu gdje bi se svi nastali produkti pri svim uvjetima stresa istovremeno određivali. Dodatno, pokazalo se da se neki produkti nastali prilikom prisilne razgradnje nikad ne razviju tijekom praćenja stabiliteta, ili da se pojavljuju samo razgradni produkti koji su pod stresnim uvjetima dobiveni u velikim količinama. Iz tog razloga postavlja se pitanje iz naslova kao i pitanje da li se u razvoju metode trebaju promatrati samo glavni razgradni produkti. U ICH smjernicama je navedeno da nije nužno istraživati pojedine razgradne produkte ako je pokazano da isti ne nastaju tijekom ubrzanih ili dugoročnih uvjeta čuvanja.⁹ Kad god je moguće, trebalo bi razviti selektivno stabilitetno-indikativnu metodu koja razdvaja sve nastale razgradne produkte nastale pod različitim uvjetima stresa. Kad je riječ o kompleksnoj razgradnji, kad to više nije moguće, onda se razvoj metode usmjerava na produkte nastale pod ubrzanim ili dugoročnim uvjetima stresa.³²

4.6.8.4. Jesu li farmakopejske metode za sadržaj stabilitetno indikativne?

Kao što je već navedeno u prethodnom poglavlju (Poglavlje 4.6.8.2.), u farmakopejama se u pojedinim monografijama razgradni produkti kontroliraju kroz odvojene testove za srodne spojeve i onečišćenja i testove čistoće. Iz tog razloga metode za određivanje sadržaja u monografijama su najčešće klasificirane kao stabilitetno specifične.

4.6.9. Balans mase

Prema definiciji ICH smjernica, u poglavlju Q1A(R2), balans mase je proces zbrajanja dobivenog sadržaja i količine nastalih razgradnih produkata da bi se vidjelo koliko odstupaju od 100%-tne početne vrijednosti tj. pojednostavljeno, količina nastalih razgradnih produkata trebala bi odgovarati smanjenju sadržaja ljekovite tvari.

Ukoliko tijekom prisilne razgradnje nastanu stabilni razgradni produkti, koji se zatim lako odjeljuju, i za koje su standardi dostupni, onda postizanje balansa mase ne bi trebao biti problem.

Ali naravno to ne mora biti tako tj. nekad se balans mase ne može lako postići, a razlozi su:³²

- nastajanje velikog broja razgradnih produkata koje uključuje kompleksne reakcijske puteve i interakciju ljekovite tvari s pomoćnim tvarima
- nepotpuna detekcija zbog nastanka razgradnih produkata koji nemaju UV kromofore
- gubitak razgradnih produkata zbog njihove hlapljivosti
- gubici razgradnih produkata kroz spremnik
- problemi eluiranja s kolone ili problemi s odjeljivanjem
- netočan ili nepoznat odgovor detektora zbog nedostatka standarada razgradnih produkata
- greške i varijabilnost prilikom određivanja sadržaja.

Uzorci značajno razgrađeni prisilnom razgradnjom mogu sadržavati i više onečišćenja koja se s kromatografske kolone eluiraju zajedno ili eluiraju zajedno s ljekovitom tvari. Nedovoljna selektivnost kromatografske metode očituje se lošim rezultatom za balans mase. Rješenje je poboljšanje selektivnosti metode i/ili razvijanje ortogonalne analitičke metode kako bi bili sigurni da su detektirani svi razgradni produkti.³⁸

Ukoliko je smanjenje sadržaja ljekovite tvari manje od količine detektiranih onečišćenja moguće je da se kod određenih uvjeta razgrađuju i prisutne pomoćne tvari. Ovako nastali razgradni produkti identificiraju se izlaganjem smjese pomoćnih tvari i otapala istim uvjetima razgradnje kao i farmaceutski proizvod. Razgradni produkti koji nisu povezani s razgradnjom ljekovite komponente često imaju i UV-Vis spektar i faktor odziva UV-detektora različit od ljekovite tvari.³³

Ni razgradni produkti povezani s razgradnjom ljekovite tvari ne moraju uvijek imati isti faktor odziva detektora kao ljekovita tvar, što također utječe na točnost izračunavanja balansa mase. Tek kad je razgradni produkt izoliran, sintetiziran i karakteriziran kao referentna supstancija, moguće je za njega odrediti točan faktor odziva detektora.

4.6.10. Čistoća kromatografskih pikova

Analiza čistoće pika (test homogenosti pika), koja se provodi da bi se potvrdila potencijalna prisutnost onečišćenja ispod glavnog pika (pik ljekovite tvari), jedan je od najbitnijih alata u validaciji stabilitetno-indikativne metode. Budući da se ne radi o jednostavnoj analizi postoji više pristupa procjeni čistoće pika, a to su direktni ili indirektni.

Direktni pristup odnosi se na upotrebu PDA, LC-MS ili LC-NMR detekcije. PDA detekcija je korisna ukoliko pikovi razgradnih produkata imaju UV spektar različit od spektra ljekovite tvari, dok LC-MS detekcija nije primjenjiva ukoliko razgradni produkt ima istu masu kao i ljekovita tvar (npr. kod diastereoizomera), kao i u slučaju kad je ionizacija razgradnog produkta supresirana koeluirajućom ljekovitom tvari.

Indirektna procjena čistoće pikova može se postići mijenjanjem jednog ili više kromatografskih parametara (npr. kolona, mobilna faza, gradijent...) koji bitno utječu na odjeljivanje pikova. Dobiveni profil onečišćenja uspoređuje se s onim originalnim, i ukoliko je broj razgradnih produkata jednak, te ukoliko je udio glavne komponente jednak, može se zaključiti da su svi razgradni produkti odijeljeni od glavne komponente. Automatizirane verzije ovog pristupa postižu se s različitim programima.³⁹

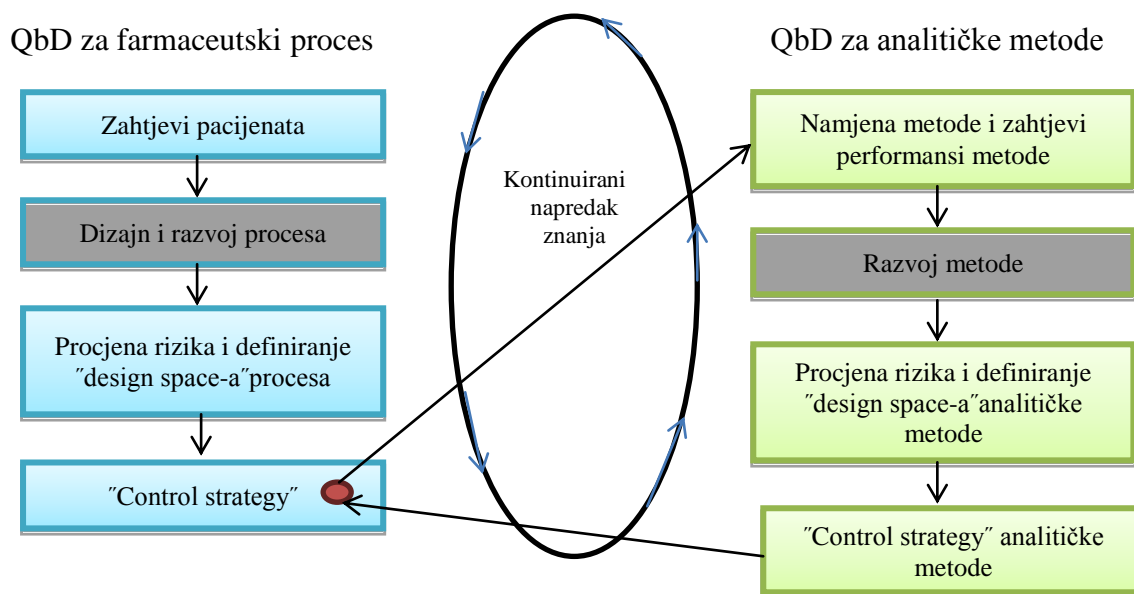
4.6.11. QbD

Dosad je uobičajena praksa bila razvijati analitičke metode principom pokušaja i pogreške, mijenjajući svaki eksperimentalni parametar pojedinačno dok se ne postigne zadovoljavajuća vrijednost svakog od njih. Ovaj je način optimiranja dugotrajan i često ovako razvijene metode nisu dovoljno robusne ili su uočeni problemi prilikom prijenosa metode iz jednog laboratorija u drugi laboratorij. Iz toga razloga razvila se potreba za sistematičnim pristupom razvoju metode tj. dizajnu kvalitete (eng. *Quality by design* – QbD).

Iako prvotno zamišljen za farmaceutski proces, dizajn kvalitete proširen je i na analitički dio odnosno na razvoj analitičkih metoda. Prema ICH smjernicama, poglavlje Q8(R2) definira dizajn kvalitete kao sistematičan pristup razvoju lijeka, koji započinje s definiranim ciljevima, pri čemu koristi znanstveni pristup i upravljanje rizikom, da bi se u konačnici postigla kontrola nad procesom.⁴⁰ Cilj je razviti metodu koja je robusna i reproducibilna prema regulatornim zahtjevima. Robusnost metode uključuje procjenu utjecaja manjih promjena na metodu u radnim uvjetima dok reproducibilnost predstavlja ponovljivost rezultata ispitivanja dobivenih analizom istog uzorka pod različitim uobičajenim uvjetima ispitivanja, kao što su različiti laboratoriji, analitičari i instrumenti.

Dva su glavna koncepta dizajna kvalitete, "*design space*" i "*control strategy*". ICH poglavlje Q8 definira "*design space*" kao multidimenzionalnu kombinaciju i interakciju karakteristika korištenog materijala i/ili parametara procesa, koja za cilj ima osigurati kontrolu procesa.⁴⁰ U farmaceutskom procesu "*design space*" bi se odnosio na prepoznavanje kritičnih parametara za polazne materijale, proizvodni proces i konačni proizvod. U analitičkom smislu tj. za analitičke metode, "*design space*" bi uključivao kombinaciju raznih parametara metode čija je uloga osigurati da metoda daje kvalitetne rezultate. Drugi koncept "*control strategy*" ima za cilj osigurati kvalitetu konačnog proizvoda.⁴¹ Analitička primjena "*control strategy*" koncepta odnosila bi se na kontrolu analitičkih faktora i parametara koji osiguravaju da su kriteriji performansi metode zadovoljeni.⁴² Na Slici 3 prikazana je shema opće podjele QbD pristupa za farmaceutske procese i za analitičke metode.⁴²

Slika 3: Shema podjele QbD pristupa za farmaceutske procese i analitičke metode



U analitičkoj primjeni nekoliko je koraka za razvoj metode prema QbD pristupu:⁴²

- definiranje cilja dizajna tj. namjene metode i zahtjeva koje metoda mora zadovoljiti
- kriteriji prikladnosti metode - kritični parametri za provedbu metode (specifičnost, selektivnost, preciznost) i granica specifikacije
- praktična upotreba metode u rutinskim analizama – vrijeme analize, prihvatljiva otapala, dostupnost opreme
- razvoj metode – odabir dizajna i povezivanje metode s namjenom i proizvodnim procesom
- procjena rizika i definiranje analitičkog "design space-a" - odnosi se na identificiranje svih potencijalnih faktora koji se mogu kontrolirati kako bi se osigurale preformance metode, te na korištenje alata za procjenu rizika i eksperimenata kojima se eliminiraju

područja rizika. Preporuka je pratiti metodu od početka do kraja u proizvodnom procesu i razdvojiti je na dijelove koji će se zatim odvojeno proučavati (npr. priprema uzorka, otapanje, ekstrakcija, kromatografsko razdvajanje, rezultati analize..). Dijagram uzroka i učinka, također poznat kao "riblja kost" ili Ishikawa dijagram, može se koristiti kako bi se sistematički naveli svi potencijalni čimbenici koji mogu utjecati na kriterije performansi metode.

- "*Control strategy*" analitičke metode – pomoću alata za procjenu rizika rizični čimbenici i kriteriji s pripadajućim rasponom definiraju se u metodi. Budući da kroz životni put metode može doći do nekih promjena, te promjene bi trebale biti unutar definiranog "*design space-a*" metode. Ukoliko izlaze izvan njega, promjene se smatraju rizičnima i u tom slučaju je potrebno napraviti novu procjenu rizika kako bi se utvrdilo da ne utječu na prikladnost metode.

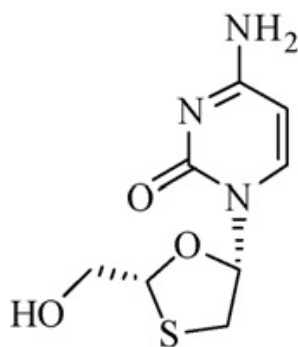
Najčešće korišteni alati za procjenu rizika su eksperimentalni dizajn (eng. *Design of Experiments*, DoE) i analiza mjernih sustava (eng. *Measuremant systems analysis*, MSA). Nakon što se napravi procjena rizika, kritični faktori najčešće se dijele u tri kategorije, visoko rizični faktori koji bi trebali biti strogo kontrolirani, potencijalno kritični faktori i faktori niskog rizika. MSA alat se koristi za procjenu reproducibilnosti metode, dok se DoE više koristi pa procjenu robusnosti metode. Glavni cilj MSA alata je da prepozna koji će faktori rizika morati biti kontrolirani, a koji neće utjecati na performanse metode tijekom uobičajenih radnih uvjeta.⁴¹ Pomoću DoE alata statistički se računa utjecaj pojedinačnih eksperimentalnih uvjeta na kromatografsko razdvajanje analita. Uz minimalan broj kromatografskih analiza i uz određene eksperimentalne uvjete,

računalni program računa optimalne vrijednosti pojedinih parametara unutar cijelog ispitivanog raspona.⁴³ Niz je računalnih programa koji se koriste za DoE: *Fusion*, *DryLab*, *JMP*, *ChromSword*, *LC Simulator* i *Design Expert*.

4.7. Eksperimentalni primjer

Za primjer identifikacije razgradnih onečišćenja i opisa razgradnih mehanizama, nakon provedene prisilne razgradnje na molekuli lamivudina, uzet je rad autora G. Bedse-a, V. Kumara i S. Singha.⁴⁴ Lamivudin pripada grupi nukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze i kao takav je dobar inhibitor virusa humane imunodeficijencije (HIV) koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS). Do ovog rada istraživanja vezana uz lamivudin odnosila su se samo na ispitivanje utjecaja kiseline, lužine, temperature, vlage i svjetla na molekulu, dok su mehanizmi razgradnje, kao i strukture razgradnih produkata, ostali nerazjašnjeni. U farmakopejama je navedeno 12 potencijalnih onečišćenja lamivudina, i njihove strukture, bez klasifikacije na procesne ili razgradne produkte. Cilj rada bio je: razgraditi lamivudin pod različitim stresnim uvjetima, razdvojiti razgradne produkte prikladnom tehnikom (LC-MS), prikupiti podatke LC-MS analize o fragmentaciji molekule i njenih razgradnih produkata, opisati strukture razgradnih produkata i objasniti mehanizam razgradnih reakcija lamivudina. Na Slici 4. prikazana je struktura molekule lamivudina.

Slika 4: Struktura molekule Lamivudina



4.7.1. Uvjeti razgradnje lamivudina

U eksperimentu su korišteni lijekovita tvar lamivudina, natrijev hidroksid (NaOH), klorovodična kiselina (HCl), vodikov peroksid (H_2O_2), acetonitril (ACN), ultra čista voda i puferne soli, a od opreme vodene kupelji, komore sa kontroliranom vlagom ($40 \pm 1^\circ\text{C}/75 \pm 3\% \text{ RH}$), svjetlosne komore s UV i fluorescentnim lampama, HPLC i MS sustavi. Za potrebe prisilne razgradnje lamivudin je izložen hidrolizi (u kiselim, lužnatim i neutralnim uvjetima), oksidaciji, fotolizi i visokoj temperaturi. Detalji ekperimenta prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16: Uvjeti prisilne razgradnje Lamivudina

Uvjet prisilne razgradnje	Koncentracija Lamivudina	Reagnes	Temperatura	Vrijeme izloženosti
Hidroliza	1 mg/ml	0.1 M HCl, 0.1 M NaOH, voda	80°C	12h, 48h, 72h
Oksidacija	1 mg/ml, 10 mg/ml	3% i 30% H_2O_2	Sobna temp.	48h
Termička razgradnja	/	/	50°C	2 mjeseca
Fotoliza (otopina)	1 mg/ml	0.1 M HCl, 0.1 M NaOH	Fluorescentno svjetlo jakosti od $1.2 \times 10^6 \text{ lx h}$ UV-A svjetlo jakosti 200 Wh/m^2	
Fotoliza (krutina)	Sloj od 1 mm			

4.7.2. Uvjeti kromatografske metode

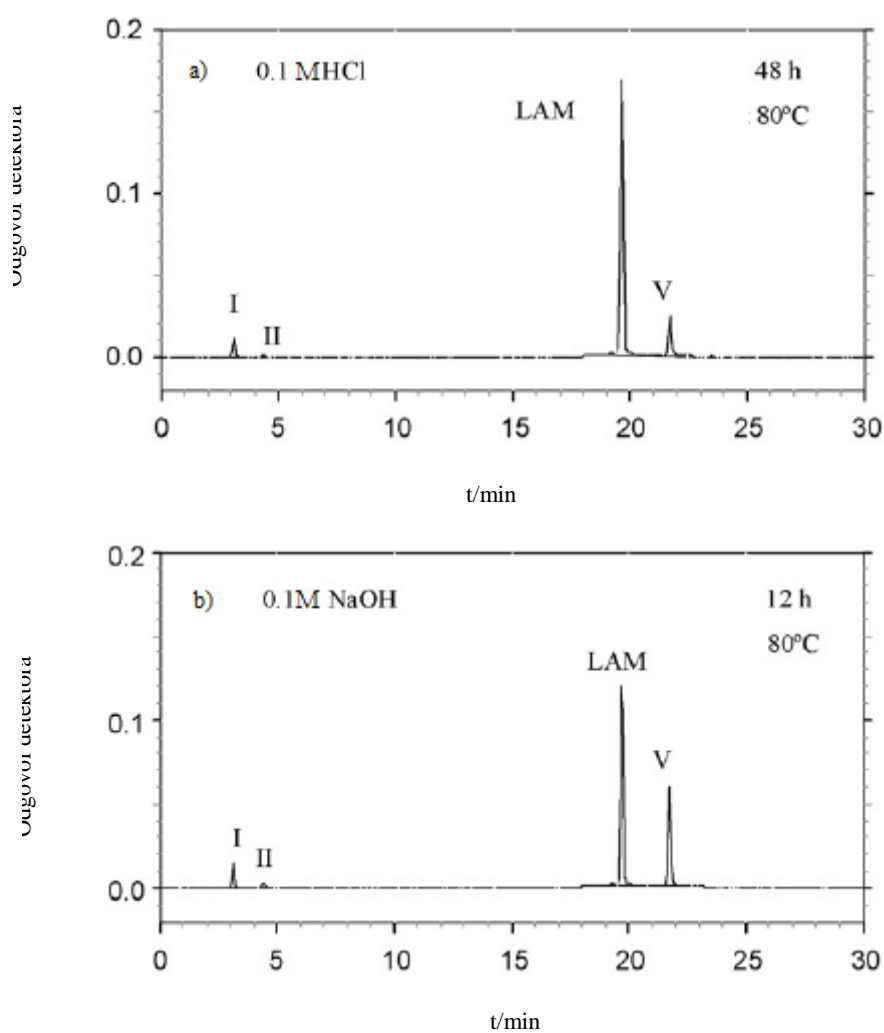
LC analiza izvedena je na C18 koloni (s punjenjem od 5 μ m) i optimiranim uvjetima, kao što su: mobilna faza metanola i pufera amonijevog acetata (0.01 M, pH 4) u različitim omjerima, valna duljina detekcije 265 nm, temperatura kolone 25°C, protok 1 mL/min i volumen injektiranja 10 μ L. Metoda za LC analizu validirana je u rasponu od 50 – 500 μ g/mL lamivudina. Provedeni su sljedeći validacijski parametri: specifičnost, linearnost, točnost, preciznost (intra- i inter-) i stabilnost otopina. Dodatno, napravljena je MS-MS/TOF analiza lamivudina u koncentraciji od 5 μ g/mL, otopljenom u diluentu metanol/voda (50:50). Korištena je pozitivna elektrosprej ionizacija. Isti uvjeti korišteni su za LC-MS/TOF analizu razgradnih produkata.

4.7.3. Rezultati kromatografske analize

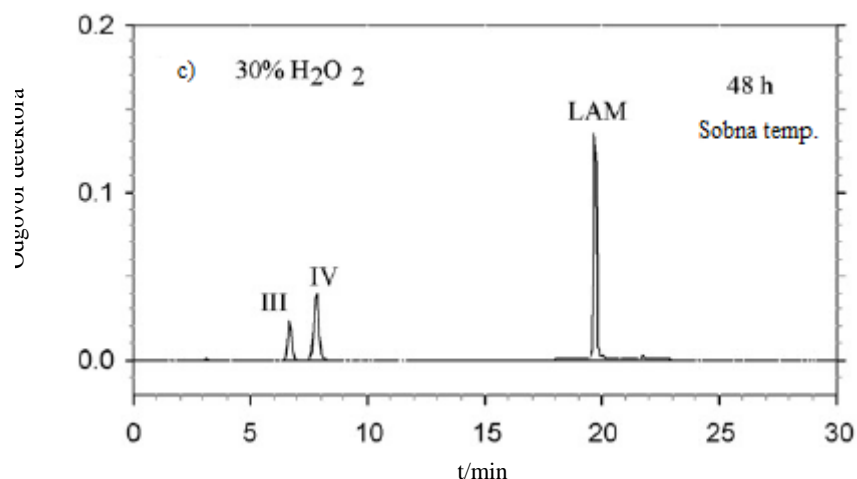
LC analizom dobiveni su kromatogrami za sve uvjete stresa navedene u Tablici 16. Dobiveno je 5 razgradnih produkata (I – V). Kromatogrami nastalih produkata pod različitim uvjetima stresa prikazani su na Slici 5 (5a – 5c). Grijanjem lamivudina u vodi na 80°C kroz 72 h nisu dobiveni razgradni produkti što upućuje na to da je stabilan u neutralnim uvjetima. U kiselim (0.1 M HCl, 48 h na 80°C) i lužnatim (0.1 M NaOH, 12 h na 80°C) uvjetima dobivena su tri razgradna produkta I, II i V (Slika 5a i 5b). Prilikom izloženosti oksidativnim uvjetima (3% H₂O₂, 48 h na sobnoj temperaturi) nije došlo do značajnije razgradnje, dok je reakcija sa 30% H₂O₂ nakon 48 h dovela do razgradnje od oko 35% i nastanka produkata III i IV (Slika 5c). Nakon 72 h došlo je do kompletne razgradnje lamivudina. Kod izloženosti lamivudina svjetlu nije došlo do razgradnje, neovisno o uvjetima (kiselu ili lužnata otopina i kruto stanje). Male količine produkata I i V nastale u su lužnatim uvjetima nakon izloženosti svjetlu kroz 10 dana, ali to se pripisuje utjecaju NaOH na temperaturi od 40°C, a ne svjetlu. Izloženost temperaturi lamivudina

u krutom stanju na 50°C kroz 2 mjeseca nije dovela do razgradnje što upućujem na stabilnost u navednim uvjetima.

Slika 5: Kromatogrami nastalih razgradnih produkata pod različitim uvjetima stresa



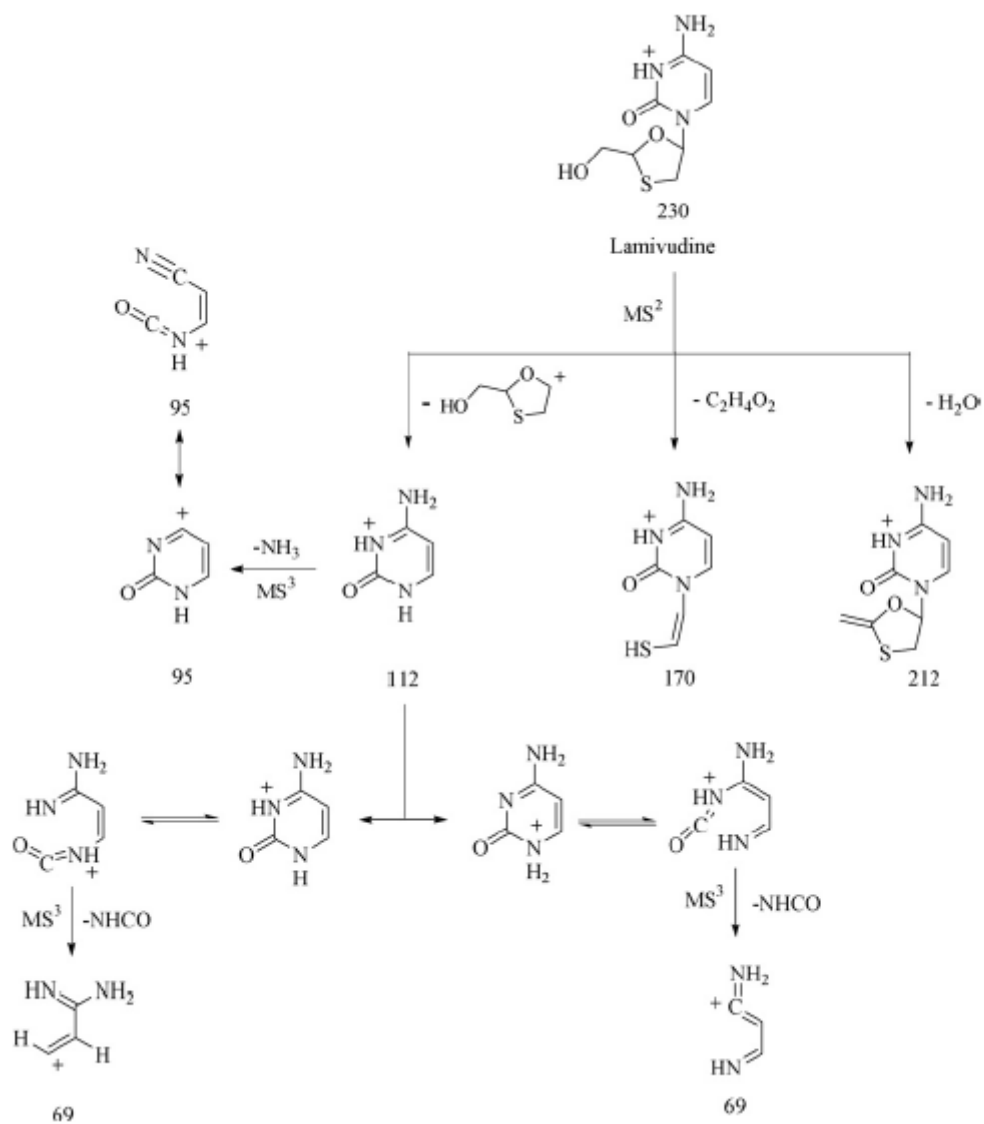
Slika 5: Kromatogrami nastalih razgradnih produkata pod različitim uvjetima stresa (nastavak)



4.7.4. Fragmentacija lamivudina pomoću MS-a

Nakon LC analize, provedena je MS analiza lamivudina i dobivena su dva pika. Pored signala protoniranog iona (M+H)⁺ pri m/z 230, u MS spektru lamivudina detektiran je i signal pri m/z 112 koji odgovara fragmentu lamivudina, nastalom uslijed cijepanja glikozidne veze. MS² i MS³ analizom dobiveni su fragmenti pomoću kojih je predložen put fragmentacije molekule lamivudina, prikazan na Slici 6.

Slika 6: Put fragmentacije lamivudina prema MS rezultatima



Na temelju fragmentacije i LC-MS/TOF analize lamivudina i smjese razgrađenih uzoraka dobivene su mase razgradnih produkata, prikazane u Tablici 17.

Tablica 17: Teorijske i dobivene molekulske mase razgradnih produkata dobivene LC-MS/TOF analizom

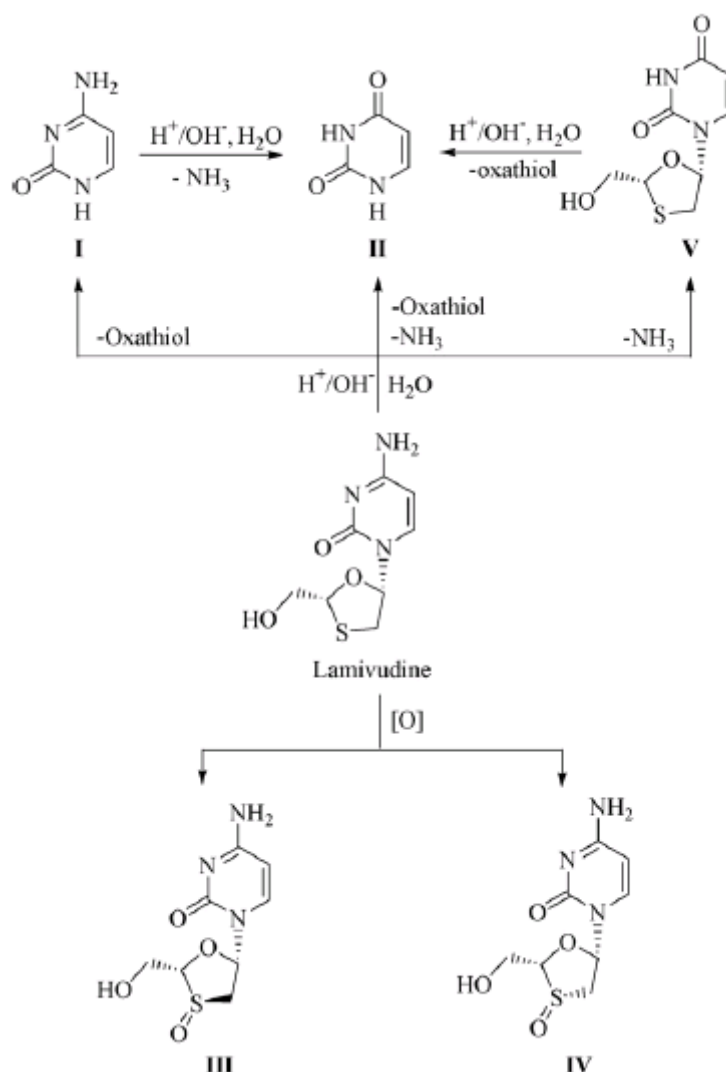
Razgradni produkt	Teorijska masa za $[M+H]^+$ ione	Dobivena masa za $[M+H]^+$ ione	Molekulska formula	Kemijski naziv produkta
I	112.0511	112.0515	$C_4H_5N_3O$	4-aminopyrimidin-2(1H)-one (cytosine)
II	113.0351	113.0347	$C_4H_4N_2O_2$	pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione (uracil)
III	246.0549	246.0545	$C_8H_{11}N_3O_4S$	4-amino-1-[(2R,3S,5S)-2-(hydroxymethyl)-3-oxo-1,3 λ 4-oxathiolan-5-yl]pyrimidin-2(1H)-one
IV	246.0549	246.0548	$C_8H_{11}N_3O_4S$	4-amino-1-[(2R,3R,5S)-2-(hydroxymethyl)-3-oxo-1,3 λ 4-oxathiolan-5-yl]pyrimidin-2(1H)-one
Lamivudin	230.0599	230.0595	$C_8H_{11}N_3O_3S$	(2R,5S)-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolan-5-yl)-(1H)-pyrimidin-2-one
V	231.0440	231.0436	$C_8H_{10}N_2O_4S$	1-[(2R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]pyrimidine 2,4(1H,3H)-dione

Male mase (m/z 112 i 113) za prva dva produkta I i II upućuju na cijepanje glikozidne veze u molekuli lamivudina, dok nedostatak sumpora u molekulskoj formuli upućuje na otpuštanje oksatiola iz molekule lamivudina. Kod produkta II prisutan je dodatno gubitak NH_3 skupine i dodatak vode. Za produkt V, koji je također nastao pod utjecajem kiselih i lužnatih uvjeta, utvrđeno je prema dobivenoj masi da je došlo do otpuštanja NH_3 u odnosu na molekulu lamivudina. Za oksidacijske produkte III i IV prema dobivenim masama, koje su iste, pretpostavljeno je da su diastereoizomeri i da su nastali oksidacijom sumpora, što se vidi po razlici mase od 16 amu u odnosu na molekulu lamivudina. Za dobivene strukture razgradnih produkata potvrđeno je da odgovaraju onečišćenjima E, F, G, H i J navedenim u WHO monografiji.

4.7.5. Mehanizam razgradnje lamivudina

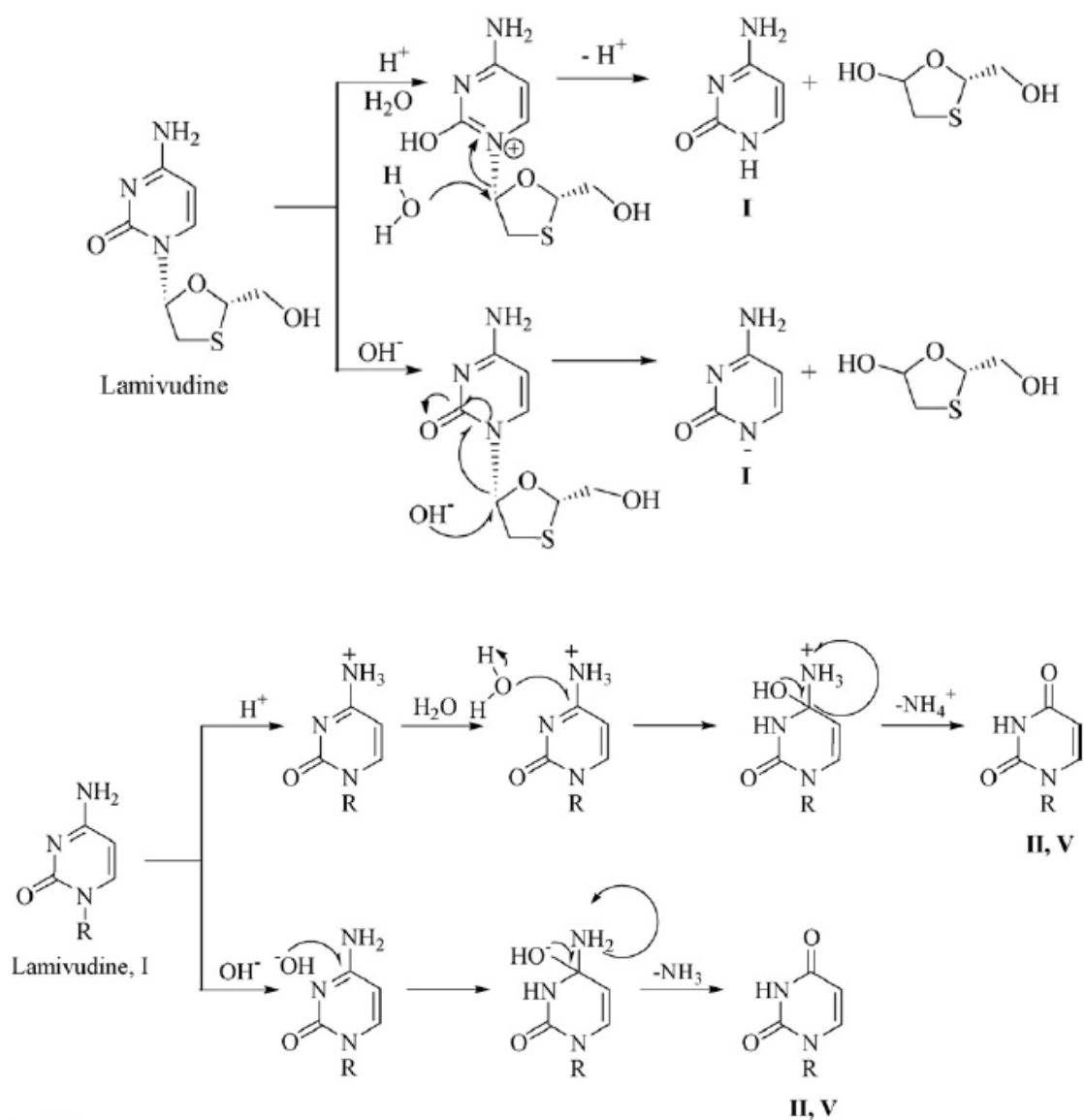
Potvrđene strukture razgradnih produkata otkrile su tri dijela molekule koja su sklona razgradnji, glikozidnu vezu, amino skupinu i sumpor u oksatiolnom prstenu. Glikozidna veza i amino skupina pokazale su podložnost hidrolitičkoj razgradnji dok je sumpor u oksatiolnom prstenu očekivano podložan oksidacijskoj razgradnji. Na temelju interpretiranih rezultata predložen je put razgradnje lamivudina, prikazan na Slici 7.

Slika 7: Put razgradnje lamivudina



Autori rada su prema dobivenim strukturama i literaturnim podacima predložili mehanizam razgradnje za produkte I, II i V (Slika 8.).

Slika 8: Mehanizam razgradnje lamivudina na produkte I, II i V



Za oksidacijske diastereoizomerne produkte III i IV mehanizam nastajanja je direktan napad kisika na sumpor u oksatiolnom prstenu.

Pomoću dobivenih rezultata autori su došli do novih informacija o ljekovitoj tvari lamivudina, koje do tada nisu bile objavljene u literaturnim izvorima. Validirana je stabilitetno indikativna LC metoda prikladna i za LC-MS analizu, te su pomoću prisilne razgradnje dobiveni razgradni produkti koji su karakterizirani. Preko struktura razgradnih produkata dobiven je fragmentacijski put molekule i nastalih produkata, put razgradnje molekule kao i mehanizam nastanka razgradnih produkata koji su navedeni u WHO monografiji kao poznata onečišćenja lamivudina.

5. ZAKLJUČAK

Stabilnost je kritičan parametar svakog lijeka i kao takav utječe na njegovu čistoću, djelotvornost i općenito na sigurnost primjene farmaceutskog oblika. Promjene u stabilnosti lijeka mogu dovesti do smanjenja doze i učinkovitosti, kao i do nastanka toksičnih razgradnih produkata. Iz tog razloga iznimno je važno istražiti profil nastalih onečišćenja pod promjenama raznih vanjskih uvjeta, kao što su temperatura, vlaga, svjetlost, pH vrijednost i drugi. Kada se govori o eksperimentalnim uvjetima pod kojima se izvodi prisilna razgradnja to su najčešće hidrolitički (kiselina ili baza), oksidacijski, fotolitički i termički uvjeti.

S regulatorne strane dolaze brojne preporuke, ali ne i detaljne upute o tome kako provoditi prisilnu razgradnju, pri čemu se ICH smjernice smatraju temeljnim polazištem prilikom njenog provođenja. Budući da smjernice ne daju detaljne upute o provođenju, nadogradnja o tome kako provoditi studiju forsirane razgradnje većinom se temelji na dosadašnjem iskustvu farmaceutskih istraživača, na znanstvenoj literaturi i karakteristikama same ljekovite tvari i/ili farmaceutskog oblika.

U novije vrijeme prisilna razgradnja postala je najvažniji alat u predviđanju dugoročne stabilnosti lijekova. Iz tog razloga studija prisilne razgradnje trebala bi biti sastavni dio razvojnog procesa svakog farmaceutskog proizvoda. Prednosti provođenja takve studije su brojne: identifikacija i otkrivanje strukture nastalih razgradnih produkata, uvid u mehanizme razgradnje molekule, razvoj i validacija stabilitetno-indikativne analitičke metode, razlikovanje nastalih razgradnih produkata u formulaciji povezanih s ljekovitom tvari od onih povezanih s nekom drugom komponentom formulacije, produciranje profila razgradnih produkata koji je

sličan profilu onečišćenja koja bi nastala pod dugoročnim stabilitetnim uvjetima, izbor odgovarajućih uvjeta čuvanja i prikladne ambalaže za lijek te poboljšanje procesa proizvodnje.

Sustavne studije prisilne razgradnje osiguravaju razvoj sigurnog i kvalitetnog gotovog farmaceutskog oblika te pouzdanih analitičkih metoda za njegovu kontrolu.

6. LITERATURA

1. S. V. Saibaba, M. Sathish Kumar and B. Ramu Pharmaceutical impurities and their characterization: A review; *European journal of pharmaceutical and medical research*, 2016, 3(5): 190-196
2. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Impurities in New Drug Substances Q3A (R2), 25. listopad 2006.
3. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Impurities in New Drug Products Q3B (R2), 25. lipanj 2006.
4. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C (R6), 20. listopad 2016.
5. Kavita Pilaniya, Harish K. Chandrawanshi, Urmila Pilaniya, Pooja Manchandani, Pratishtha Jain and Nitin Singh, Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals, *Journal of advanced pharmaceutical technology and research*, 2010 Jul-Sep, 1(3): 302-310
6. Arup K. Basak, Andre S. Raw, Ali H. Al Hakim, Scott Furness, Nashed I. Samaan, Devinder S. Gill, Has Mukh B. Patel, Roslyn F. Powers, Lawrence Yu, Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications, Science direct, *Advanced drug delivery reviews* 59 (2007), 64 – 72

7. Shreya R. Shah, Mayur A. Patel, Miral V. Naik, P.K. Pradhan, and U.M. Upadhyay, Recent approaches of "Impurity profiling" in pharmaceutical analysis: A review, *International Journal of pharmaceutical sciences and research* (2017): 2012; Vol. 3(10): 3603-3617
8. Rubén M. Maggio, Silvana E. Vignaduzzo, Teodoro S. Kaufman, Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations, *Trends in Analytical Chemistry*, 49 (2013) 57-70
9. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2), 6.veljače 2003.
10. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B, 6.studeni 1996.
11. Klick, Silke, Muijselaar, Pim G., Waterval, Joop, Eichinger, Thomas, Korn, Christian, Gerding, Thijs K., Debets, Alexander J., Sängner-Van De Griend, Cari, Van Den Beld, Cas, Somsen, Govert W., De Jong, Gerhardus J., Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products, *Pharmaceutical Technology*, (2005), 29(2), 48-66.
12. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2(R1), 27.listopad 1994.
13. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Stability testing of Biotechnological/Biological Products, ICH Q5C, 30.studeni 1995.

14. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, The common Technical Document (CTD): Quality, M4Q(R1), 12. rujna 2002.
15. Saranjit Singh, Mahendra Junwal, Gajanan Modhe, Harsita Tiwari, Moolchand Kurmi, Neha Parashar, Padmaja Sidduri, Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products, *Trends in Analytical Chemistry*, 49 (2013) 71-88
16. World Health Organization (WHO), Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, WHO Technical report series 953, Annex 2, Geneva, Switzerland, 2009.
17. World Health Organization (WHO), WHO Guidelines for Registration of Fixed-Dose Combination Medicinal Products, WHO Technical report series 929, Annex 5, Geneva, Switzerland, 2005.
18. World Health Organization (WHO), Guidelines on Submission of Documentation for a Multisource (Generic) Finished Pharmaceutical Product: Quality Part, Draft for comments, Geneva, Switzerland, 2013.
19. World Health Organization (WHO), *"Guidelines on Stability Evaluation of Vaccines"* , Geneva, Switzerland, 2006.
20. American Food and Drug Administration (USFDA), Guidance for Industry: Stability Testing of Drug Substances and Drug Products, Draft Guidance, Rockville, USA, 1998.

21. American Food and Drug Administration (USFDA), INDs for Phase 2 i Phase 3 Studies: Chemistry, Manufacturing, and Control Information, Draft Guidance, Rockville, USA, 2003.
22. American Food and Drug Administration (USFDA), Guidance for Industry: Botanical Drug Products, Rockville, USA, 2004.
23. American Food and Drug Administration (USFDA), Guidance for Industry: Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product, Draft Guidance, Rockville, USA, 2012.
24. European Medicines Agency (EMA), Requirements to the chemical and pharmaceutical quality documentation concerning investigational medicinal products in clinical trials, Reference number EMA/CHMP/QWP/545525/2017, 28.05.2018.
25. European Medicines Agency (EMA), Guideline on the requirements for quality documentation concerning biological investigational medicinal products in clinical trials, Reference number EMA/CHMP/BWP/534898/2008, 26.04.2018.
26. European Medicines Agency (EMA), Stability testing of existing active ingredients and related finished products, Reference number CPMP/QWP/122/02, 01.03.2004.
27. European Medicines Agency (EMA), Guideline on quality of transdermal patches, Reference number EMA/CHMP/QWP/608924/2014, 17.06.2015.

28. P.Tattersall, S. Asawasiripong, I. Takenaka, John A. Castoro, Impact from the Recent Issuance of ANVISA Resolution RDC-53/2015 on Pharmaceutical Small Molecule Forced Degradation Study Requirements, *American Pharmaceutical Review*, (2016)
29. CSDCO, Guidelines on Similar Biologics: Regulatory Requirements for Marketing Authorization in India, New Delhi, India (2012)
30. John Kovalski, Bela Kraut, Annette Mattiuz, Michael Giangulio, Geoffrey Brobst, Wayne Cagno, Prakash Kulkarni, Taylor Rauch, Impurities in generic pharmaceutical development, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007) 56-63
31. M Blessy, Ruchi D Patel, Prajesh N Prajapati, Y.K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, (2013)
32. Monika Bakshi, Saranjit Singh, Development of validated stability-indicating assay methods - critical review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002) 1011-1040.
33. Saranjit Singh and Monika Bakshi, Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs, *Pharmaceutical Technology On-line*, (2000).
34. S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, *Informa*, UK, (2011)
35. Vamsi Krishna Marothu, Rajendra N. Dash, Saritha Vemula, Shravani Donkena, Ramesh Devi, Madhavi Gorrepati, Kinetics study of metaxalone degradation under hydrolytic, oxidative

and thermal stress conditions using stability-indicating HPLC method, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2 (2012) 431-436.

36. Nishath Fathima, Tirunagari Mamatha, Husna Kanwal Qureshi, Nandagopal Anitha and Jangala Venkateswara Rao, Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (2011) 66-71.

37. Boccardi G., Autooxidation of drugs: prediction of degradation impurities from results of reaction with radical chain initiators, *Il Farmacao* (1994), 49: 431-5

38. Steven W. Baertschi, Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities Original Research Article, *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (2006) 758-767.

39. Kim Huynh-Ba, Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development, Chapter 7 Development of Stability Indicating Methods, Springer, 2009.

40. International conference of harmonization (ICH), *Harmonised Tripartite Guideline*, Pharmaceutical Development, Q8(R2), kolovoz, 2009.

41. Frederick G. Vogt, Alireza S.Kord, Development of Quality-By-Design Analytical Methods, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 100, izdanje 3.ožujak 2011, 797-812

42. Borman P, Nethercote P, Chatfield M, Thompson D, Truman K., The application of quality by design to analytical methods, *Pharm Tech*, 31:142–152, (2007)

43. K. Monks, I. Molnár, H.-J. Rieger, B. Bogáti, E. Szabó, Quality by Design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation, *Journal of Chromatography A*, 1232 (2012) 218-230
44. G. Bedse, V. Kumar i S. Singh, Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC-MS/TOF and MSⁿ, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (2009) 55-63

7. KRATICE

ICH (eng. *International Conference on Harmonization*) – Međunarodna konferencija o harmonizaciji

EMA (eng. *European Medicines Agency*) – Europska agencija za lijekove

FDA (eng. *Food and Drug Administration*) – Američka agencija za hranu i lijekove

WHO (eng. *World Health Organization*) – Svjetska zdravstvena organizacija

TDI (eng. *Total daily intake*) – ukupni dnevni unos

SPE (eng. *Solid phase extraction*) - ekstrakcija na čvrstoj fazi

SFE (eng. *Solid fluid extraction*) - supekritična fluidna ekstrakcija

TLC (eng. *Thin layer chromatography*) – tankoslojna kromatografija

GC (eng. *Gas Chromatography*) – plinska kromatografija

HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography*) – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

SFC (eng. *Super fluid chromatography*) - superkritična fluidna kromatografija

CE (eng. *Capillary Electrophoresis*) – kapilarna elektroforeza

EPR (eng. *Electron paramagnetic resonance*) – elektron paramagnetska rezonancija

UV-Vis (eng. *Ultraviolet and visible*) – ultraljubičasto i vidljivo zračenje

IR (eng. *Infrared*) – infracrveno zračenje

MS (eng. *Mass spectrometry*) – masena spektrometrija

NMR (eng. *Nuclear paramagnetic resonance*) - nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija

HILIC (eng. *Hydrophilic interaction chromatography*) - kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama

UPLC (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) - kromatografija ultravisoke djelotvornosti

LC-MS - vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije

USP (eng. *United States Pharmacopeia*) – farmakopeja Sjedinjenih Američkih Država

SIM (eng. *Stability Indicating Method*) – stabilitetno indikativna metoda

PDA (eng. *Photodiode Array Detector*) – fotodiodni detektor

QbD (eng. *Quality by Design*) – Dizajn kvalitete

DoE (eng. *Design of Experiments*) – dizajn eksperimenta

MSA (eng. *Measuremant Systems Analysis*) - analiza mjernih sustava

HIV (eng. *human immunodeficiency viruses*) - virus humane imunodeficijencije

AIDS (eng. *acquired immunodeficiency syndrome*) - sindrom stečene imunodeficijencije

8. ŽIVOTOPIS

<u>Osobni podaci</u> Ime i prezime Adresa Telefon E-mail Datum rođenja	Mijona Zelen Biokovska ulica 50a +385958236729 mijonab@gmail.com 30.06.1983.
<u>Radno iskustvo</u> Razdoblje Radno mjesto Poslodavac Odgovornosti	01.10.2016. – Vodeći istraživač analitičar Analitika II, Istraživanje i razvoj, Pliva Hrvatska - rad s GC, GC-MS, HPLC i IC tehnikom - razvoj i validacija analitičkih metoda 15.07.2014. – 30.09.2016. Istraživač analitičar specijalist Analitika parenteralnih dozirnih oblika, Istraživanje i razvoj, Pliva Hrvatska - rad s GC, GC-MS i IC tehnikom - razvoj i validacija analitičkih metoda 01.07.2011. – 14.07.2014. Istraživač analitičar Analitika parenteralnih dozirnih oblika, Istraživanje i razvoj,